

**Государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
“Уральский государственный медицинский университет”  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

**Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии**

**Литусов Н.В.**

**Бактериоскопические методы исследования**

**Иллюстрированное учебное пособие**

**Екатеринбург, 2015**

УДК 612

Рецензент: доктор медицинских наук профессор заведующий кафедрой инфекционных болезней ГБОУ ВПО УГМУ Борзунов В.М.

Литусов Н.В. Бактериоскопические методы исследования. Иллюстрированное учебное пособие. – Екатеринбург: Изд-во ГБОУ ВПО УГМУ, 2015. - 55 с.

В иллюстрированном учебном пособии рассматривается устройство микроскопа, описываются разновидности световой и электронной микроскопии, методы микроскопического исследования живых и окрашенных бактерий. Учебное пособие включает также вопросы для самоконтроля усвоения темы, тренировочные тесты, список учебной и методической литературы. В приложениях представлены рецепты приготовления красок для окрашивания бактерий и их структурных компонентов.

Учебное пособие предназначено для внеаудиторной подготовки и контроля усвоения материала студентами, обучающимися по специальностям 060101 (лечебное дело), 060103 (педиатрия), 060105 (медико-профилактическое дело), 060201 (стоматология) и 060301 (фармация) при освоении дисциплины Микробиология.

© Литусов Н.В.

© УГМУ, 2015

## Содержание

Введение .....	4
История открытия микроскопа .....	5
Устройство светового микроскопа .....	12
Разновидности световой микроскопии .....	19
Правила обращения со световым микроскопом .....	27
Электронная микроскопия.....	27
Оборудование рабочего места для микроскопирования .....	31
Подготовка предметных стекол для микроскопического исследования.....	33
Приготовление препаратов для микроскопирования микробов в живом состоянии	34
Приготовление препаратов для микроскопирования микробов в окрашенном состоянии.....	35
Приложение 1. Рецепты приготовления растворов красителей .....	46
Приложение 2. Методы окрашивания микробов .....	49
Вопросы для контроля усвоения материала .....	51
Тренировочные тесты .....	52
Список литературы.....	53

## Введение

При микробиологической диагностике бактериальных инфекций используются следующие методы исследования:

1. **Микроскопический (бактериоскопический) метод.** Он направлен на обнаружение в исследуемом материале бактерий - возбудителей инфекций и изучение их морфологических и тинкториальных свойств. Морфологические свойства характеризуются формой и размером клеток, а тинкториальные свойства – отношением микроорганизмов к красителям.

2. **Бактериологический метод.** Этот метод предусматривает выделение чистой культуры возбудителя и его идентификацию путем изучения культуральных и биохимических свойств микроорганизмов. Культуральные свойства описываются характером роста микробов на питательных средах (форма, размер, особенности колоний, формирующихся на плотных средах, а также характер роста культуры в жидких средах). Биохимические свойства характеризуются способностью к ферментации углеводов (сахаролитическая активность), белков (протеолитическая активность), липидов (липолитические свойства) и других соединений.

3. **Биологический метод.** Он направлен на изучение особенностей взаимодействия возбудителя с макроорганизмом, патогенности и вирулентности возбудителя путем введения в организм лабораторных животных чистой культуры бактерий.

4. **Серологический метод.** С помощью серологических реакций изучается антигенная структура возбудителя и определяются антитела, образующиеся в организме человека или лабораторных животных в ответ на внедрение антигена (возбудителя).

5. **Аллергологический метод.** Он позволяет определить реакцию организма на воздействие антигенов – аллергенов.

6. **Молекулярно-генетические методы,** позволяющие выявлять фрагменты генома возбудителей в исследуемом материале с помощью молекулярной гибридизации или полимеразной цепной реакции.

Часто при диагностике бактериальных инфекций первостепенное значение приобретают микроскопические (бактериоскопические) методы, позволяющие обнаружить и изучить морфологические и тинкториальные свойства микробов, то есть предположить этиологию заболевания и определить чистоту выделенной культуры. Следовательно, микроскопический метод является первым этапом микробиологической диагностики. Однако этот метод имеет ориентировочное значение, так как его чувствительность составляет примерно 100000 клеток в 1 мл исследуемого материала.

Для микроскопического исследования применяют световую микроскопию и ее разновидности (темнопольную микроскопию, фазово-контрастную микроскопию, люминесцентную микроскопию), а также электронную микроскопию.

## История открытия микроскопа

Микробные клетки измеряются в микрометрах – мкм ( $10^{-6}$  м). Средний размер микробных клеток составляет 1-4 мкм, а глаз человека способен различать объекты размером 100 мкм и более. Поэтому микробы невооруженным глазом увидеть нельзя. Для визуализации микроорганизмов их изображение увеличивают с помощью специальных оптических приборов, называемых **микроскопами** (*micro* - мелкий, *scopio* - смотрю, вижу). Процесс изучения формы и структуры микробных клеток с помощью микроскопа называется **микроскопией**.

Первое увеличивающее оптическое устройство изобрел в 1612 г. итальянский физик **Галилео Галилей** (рисунок 1).

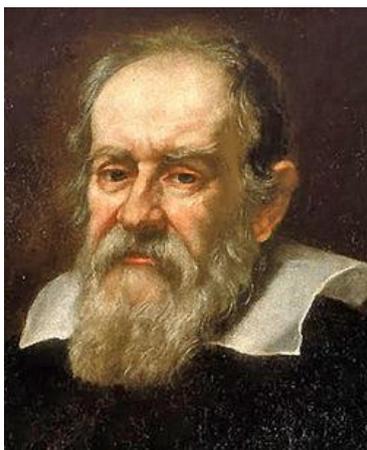


Рисунок 1 - Галилео Галилей (Galileo Galilei, 1564-1642 гг.) и его микроскоп.

В 1624 г. Галилео Галилей разработал составное оптическое устройство (рисунок 2), которое он назвал “оккиолино” (итал. *occholino* – маленький глаз).



Рисунок 2 – “Оккиолино” Галилео Галилея.

Друг Галилео Галилея по “Академии зорких” Джованни Фабер (Giovanni Faber) в 1625 г. для обозначения нового прибора предложил термин “микроскоп”. Микроскоп Галилея представлял собой всего лишь зрительную трубу с линзами и

небольшим увеличением, недостаточным для обнаружения микроорганизмов, поэтому Галилео Галилей с помощью своего микроскопа изучал насекомых.

Первый микроскоп, пригодный для обнаружения крупных микробов, сконструировали в Голландии шлифовальщики стекол (мастера очков) **Ханс Янсен** и его сын **Захариас Янсен** (рисунок 3).



Рисунок 3 - Захариас Янсен (Sacharias Jansen, примерно 1585-1632 гг.) и микроскоп Янсенов.

Изготовленный ими микроскоп давал увеличение в 32 раза и представлял собой две выпуклые линзы внутри одной трубки, то есть больше напоминал современный телескоп, нежели микроскоп. Однако с помощью такого оптического устройства римский преподаватель медицины **Атанасиус (Афанасий) Кирхер** (рисунок 4) обнаружил в гниющих продуктах (мясе, молоке) и в крови больных чумой людей живые существа, названные им “червячками”. Он полагал, что наблюдаемые им живые существа произошли из неживых органических соединений.



Рисунок 4 - Атанасиус Кирхер (Athanasius Kircher, 1602-1680 гг.).

Наибольшую известность получили исследования голландского естествоиспытателя **Антони ван Левенгука** (рисунок 5). Будучи продавцом сукна,

он в свободное от работы время увлекался модной тогда в Голландии шлифовкой стекол и конструированием линз.



Рисунок 5 - Антони Ван Левенгук (Antoni van Leeuwenhoek, 1632-1723 гг.).

В 1673 г. он изобрел микроскоп, дающий увеличение в 150-300 раз. Микроскоп Левенгука представлял собой двояковыпуклую линзу с очень коротким фокусным расстоянием, поэтому при работе микроскоп необходимо было подносить очень близко к глазам (рисунок 6).

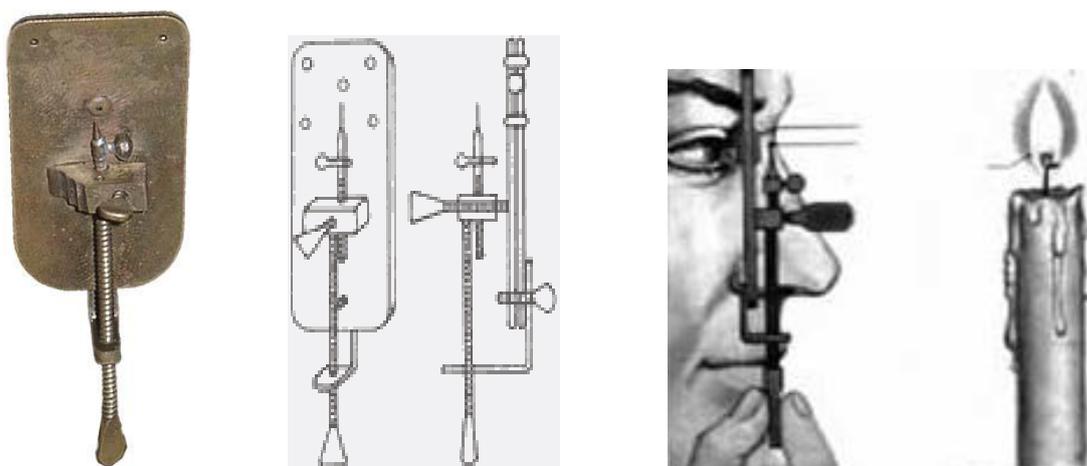


Рисунок 6 - Микроскоп А. Левенгука и его применение.

Рассматривая с помощью изобретенного им микроскопа налет с зубов, испражнения, кровь и другие объекты, А. Левенгук описал неизвестные образования шарообразной, палочковидной и извитой формы. Обнаруженные организмы он назвал “зверушками” или “анималькулюсами”. Свои зарисовки и описания “анималькулюсов” А. Левенгук направлял в Лондонское королевское научное общество. Эти описания сначала печатались в научных журналах, а в 1695 г. были изданы на латинском языке отдельной книгой под названием “Тайны природы, открытые Антони ван Левенгуком при помощи микроскопов”. Зарисовки Левенгука отражали увиденное им многообразие живых существ (рисунок 7).

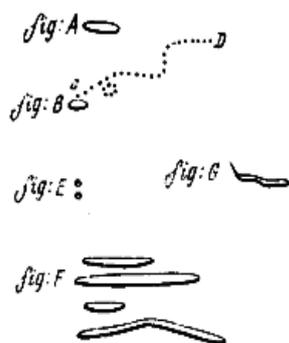


Рисунок 7 - Зарисовки микробов, сделанные А. Левенгуком.

Первым из россиян, кто увидел микробов, был Петр I. Он посетил в Голландии А. Левенгука и привез в Россию его микроскоп.

В последующем микроскоп многократно совершенствовался. Наибольший вклад в разработку микроскопа внес английский естествоиспытатель **Роберт Гук** (рисунок 8), впервые описавший растительную клетку. Микроскоп Гука представлял собой уже сложную систему линз, объектива и окуляра.



Рисунок 8 - Роберт Гук (Robert Hooke, 1635-1703 гг.) и его микроскоп.

Р. Гук впервые в 1678 г. описал технику иммерсии (лат. *immersio* - погружение) для повышения контрастности изображения. В 1827 г. итальянский астроном и оптик Д.Б. Амичи (рисунок 9), используя технику иммерсии, сконструировал иммерсионный объектив микроскопа.

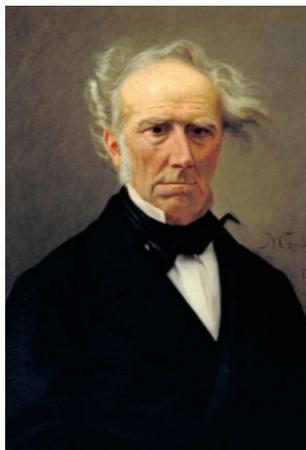


Рисунок 9 – Джованни Баттиста Амичи (Giovanni Battista Amici, 1786-1863 гг.).

В 1904 г. австрийский ученый А. Кёлер (A. Keller) для микроскопических исследований использовал феномен люминесценции, то есть свечение объекта в результате испускания части поглощенной энергии в виде кванта света с большей длиной волны. В 1908 г. А. Кёлер совместно с австрийским ученым Г. Зидентопфом (H. Siedentopf) сконструировали первый люминесцентный микроскоп.

Важнейшими характеристиками микроскопа являются увеличение и разрешающая способность. **Увеличение микроскопа** – это отношение линейных размеров изображения к линейным размерам рассматриваемого предмета. Увеличение микроскопа определяется как произведение увеличения объектива на увеличение окуляра. Типичные исследовательские микроскопы имеют увеличение окуляра 10, а увеличение объективов – 10, 45 и 100. Следовательно, увеличение такого микроскопа составляет от 100 до 1000.

**Разрешающая способность микроскопа** – это минимальное расстояние между двумя точками, которые в микроскопе наблюдаются раздельно. Разрешение человеческого глаза в режиме наилучшего видения равно 0,2 мм. Микроскоп Янсенов имел увеличение в 30 раз, а его разрешающая способность неизвестна. Микроскоп А. Левенгука имел увеличение в 150-300 раз, его разрешающая способность составляла 0,5 микрона. Современные микроскопы имеют увеличение в 1000 раз, а разрешающую способность - 0,25 микрона.

Световые микроскопы имеют недостаток, связанный с аберрациями оптических систем - дефектами или погрешностями изображения, обусловленными отклонением луча от того направления, по которому он проходил бы в идеальной оптической среде. В результате аберраций наблюдаются размытые границы, постороннее окрашивание, цветные контуры исследуемых объектов.

В 1930 - 1933 гг. голландский физик Ф. Цернике (рисунок 10) при изучении оптических аберраций (ошибок или погрешностей оптической системы) разработал метод фазового контраста для микроскопии прозрачных или слабо рассеивающих свет объектов.



Рисунок 10 – Фриц Цернике (Frits Zernicke, 1888 – 1966 гг.).

За изобретение фазово-контрастного микроскопа в 1953 г. он был удостоен звания лауреата Нобелевской премии.

Для изучения тонкой структуры прокариотических и эукариотических клеток и особенно вирусов возможности световых микроскопов ограничены. Для этих целей используются электронные микроскопы. Первый просвечивающий электронный микроскоп (ПЭМ) сконструировали в 1931 г. немецкие инженеры-электронщики М. Кнолл и Э. Руска (рисунок 11).

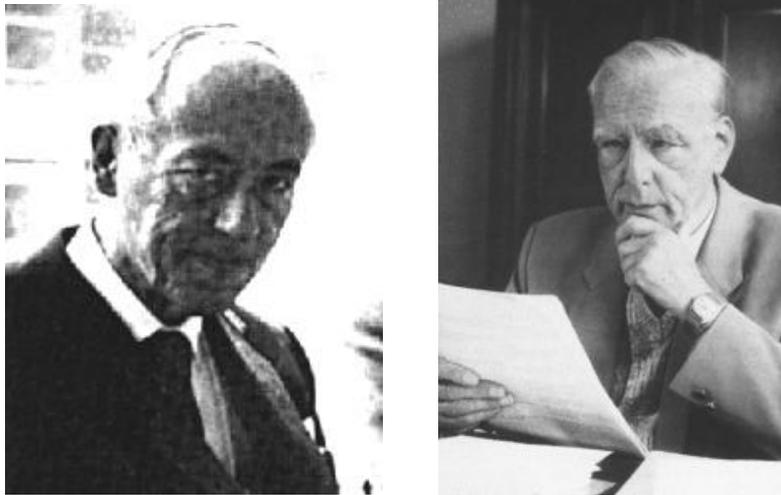


Рисунок 11 - Макс Кнолл (Max Knoll, 1897-1969 гг.) и Эрнст Руска (Ernst Ruska, 1906-1988 гг.).

В 1986 г. Э. Руска за разработку электронного микроскопа был удостоен Нобелевской премии. Первые электронные микрофотографии представителей мира микробов - вирусов бактерий или бактериофагов получил брат Э. Руска - Г. Руска (рисунок 12).

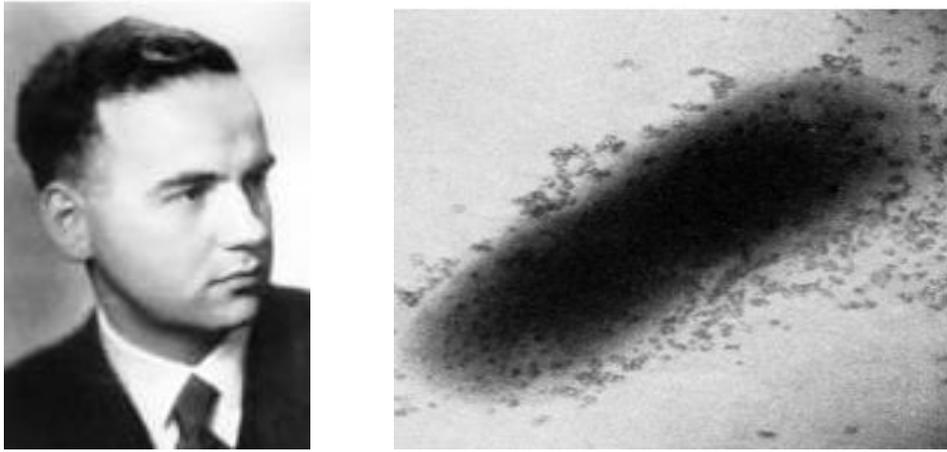


Рисунок 12 - Гельмут Руска (Helmut Ruska, 1908-1973 гг.) и сделанная им электронная фотография кишечной палочки, инфицированной бактериофагом.

В 1938 г. немецкий физик Манфред фон Арденне (рисунок 13) сконструировал первый сканирующий просвечивающий электронный микроскоп (СПЭМ или STEM), добавив к просвечивающему электронному микроскопу сканирующую систему.



Рисунок 13 – Манфред фон Арденне (Manfred von Ardenne, 1907 – 1997 гг.).

В 1948 г. английские специалисты под руководством Чарльза Отли (Charles William Oatley, 1904-1996 гг.) разработали первый растровый (сканирующий) электронный микроскоп (РЭМ или SEM). С помощью растрового электронного микроскопа достигалось трехмерное изображение исследуемого объекта.

В настоящее время в микробиологических лабораториях используются следующие методы микроскопических исследований:

1. Световая микроскопия и ее разновидности (светлопольная, иммерсионная, фазово-контрастная, темнопольная, люминесцентная микроскопия).
2. Электронная микроскопия (просвечивающая и сканирующая).

## Устройство светового микроскопа

Световой микроскоп предназначен для увеличения изображения изучаемого объекта в видимом свете без его искажения. Выделяют следующие части светового микроскопа:

- механическая часть;
- оптическая (увеличительная) часть;
- осветительная часть.

В свою очередь, каждая часть светового микроскопа состоит из отдельных деталей (элементов). Основные детали светового микроскопа представлены на рисунке 14.



Рисунок 14 – Основные детали светового микроскопа.

Отечественные световые микроскопы по конструкции и комплектации оптикой подразделяются на студенческие, рабочие, лабораторные и исследовательские, поэтому имеют соответствующие обозначения: С – студенческие, Р – рабочие, Л – лабораторные, И – исследовательские.

**Механическая часть микроскопа** предназначена для объединения оптической (увеличительной) и осветительной частей микроскопа. Она включает штатив, коробку для размещения механизмов макро- и микровинтов, основание, предметный столик, тубус, револьвер для крепления и смены объективов, приспособление для крепления конденсора и система винтов для перемещения отдельных частей. **Штатив** представляет собой дугообразный элемент, соединенный с **коробкой**, предназначенной для размещения механизмов для грубой (макрвинт) и тонкой (микровинт) настройки изображения. Прямоугольное или подковообразное **основание** обеспечивает устойчивость микроскопа. В верхней части коробки располагается **предметный столик** круглой или прямоугольной формы (рисунок 15).



Рисунок 15 – Предметные столики световых микроскопов.

На предметном столике в специальных отверстиях располагаются клеммы-зажимы для фиксации предметных стекол. По сторонам предметного столика имеются центровочные винты, при помощи которых столик перемещается в разных направлениях, что позволяет передвигать изучаемый препарат.

В верхней части штатива располагается **тубусодержатель** и **револьверное устройство** (револьверная насадка, револьвер), состоящее из двух пластин. Верхняя пластина револьвера закреплена неподвижно, а нижняя пластина вращается. В нижней пластине имеются гнезда с резьбой для установки объективов (рисунок 16).



Рисунок 16 – Револьверное устройство микроскопа с объективами.

**Тубус** микроскопа может быть наклонный или прямой. В верхней части тубуса располагается окуляр. Для грубой настройки изображения изучаемого объекта служит макрометрический винт (макрвинт), для точной настройки – микрометрический винт (микровинт). При вращении макрометрического и микрометрического винтов по часовой стрелке объектив опускается, а при вращении винтов против часовой стрелки объектив поднимается.

Микроскопы могут быть монокулярными, бинокулярными и тринокулярными (рисунок 17). Бинокулярные микроскопы имеют два наклонных тубуса, что позволяет рассматривать препарат двумя глазами одновременно. Тринокулярные микроскопы позволяют не только изучать препарат, но и проводить фото- и видеорегистрацию результатов исследования.



Рисунок 17 – Монокулярный (а), бинокулярный (б) и тринокулярный (в) световые микроскопы.

**Оптическая часть** светового микроскопа включает объективы и окуляры. **Объектив** представляет собой систему линз, закрепленных в металлическую оправу (рисунок 18).



Рисунок 18 – Объективы светового микроскопа.

На верхнем конце оправы имеется резьба для крепления объектива в гнезде револьвера. Обращенная к препарату линза называется фронтальной, она производит основное увеличение изучаемого объекта. Остальные линзы объектива называются коррекционными. Они предназначены для устранения недостатков оптического изображения.

В зависимости от конструкции, разные объективы обеспечивают разное увеличение исследуемого объекта. **Кратность увеличения** объекта указывается на оправе объектива. Например, объективы малого увеличения обозначаются как 8х, 20х, объективы большого увеличения – 40х, иммерсионные объективы – 90х. Кроме того, на объективе указывается тип оптической коррекции, числовая апертура, иммерсионная среда (рисунок 19).

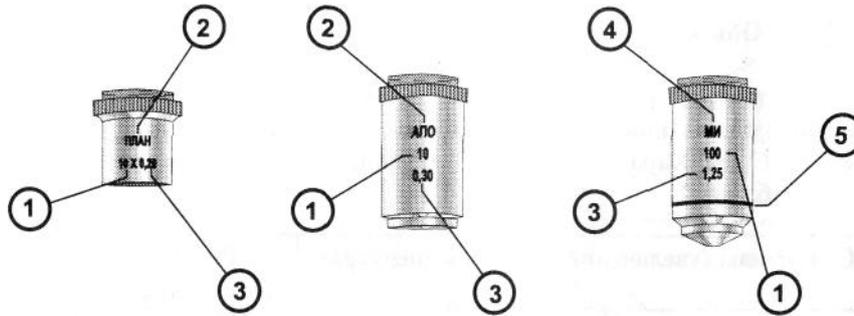


Рисунок 19 – Маркировка объективов: 1 – увеличение объектива; 2 – тип оптической коррекции (ПЛАН – объективы – ахроматы с плоским полем, АПО – объективы – апохроматы); 3 – числовая апертура; 4 – иммерсионная среда (МИ или Oil – масляная иммерсия, ВИ или W – водная иммерсия); 5 – цветовая маркировка иммерсионных объективов (черное кольцо – масляная иммерсия, белое кольцо – водная иммерсия).

На корпусе современных объективов указывают также оптическую длину тубуса (например, 160 мм) и толщину покровного стекла (например, 0,17 мм), используемого в работе (рисунок 20).



Рисунок 20 – Маркировка современного объектива.

**Числовая апертура** характеризует разрешающую способность микроскопа (качество изображения). Чем больше числовая апертура, тем более высокое разрешение имеет объектив, что позволяет различать более мелкие детали.

При использовании оптических систем изображение исследуемых объектов искажается. Основными ошибками или погрешностями изображения являются искажения цвета (появление цветных ореолов – хроматические aberrации) или неравномерности изображения по полю зрения (размытость или неравномерность изображения – кривизна поля). По степени исправления хроматических aberrаций объективы подразделяются на **ахроматические** (ахроматы) и **апохроматические** (апохроматы). Ахроматические объективы исправляют хроматическую aberrацию для длин волн двух цветов (красный и синий), а также сферическую aberrацию для длины волны одного цвета (зеленого). При использовании ахроматических объективов радужная окантовка исследуемых объектов все же остается заметной. Ахроматы имеют маркировку ACHRO. Апохроматические объективы корректируют хроматизм для длин волн трех цветов (красного, синего и зеленого), а также

исправляют сферическую aberrацию для длин волн двух-трех цветов. Поэтому апохроматы дают более четкое изображение. Апохроматические объективы маркируются АРО. Объективы, устраняющие неравномерности изображения по полю зрения (кривизну поля), обозначаются приставкой план- (PLAN – планохроматический объектив, Plan АРО – планапохроматический объектив).

Многие производители в настоящее время предлагают флюоритовые объективы, которые имеют маркировку Fluo (Fluorite). В этих объективах хроматические aberrации устранены также как и в ахроматических объективах для длин волн двух цветов (синего и красного), а сферические aberrации – для длин волн двух-трех цветов (синего, красного, зеленого). Поэтому флюоритовые объективы отличаются высокой разрешающей способностью и лучшим контрастом по сравнению с ахроматическими объективами.

По способу применения все объективы делят на сухие и иммерсионные или погружные (immersio - погружение). У **сухих объективов** между фронтальной линзой и изучаемым препаратом находится воздух, у **иммерсионных объективов** пространство между фронтальной линзой и препаратом заполнено иммерсионным маслом (кедровым, касторовым, гвоздичным и др.) или водой.

**Окуляры** состоят из набора плосковыпуклых линз, помещенных в металлический цилиндр. Линза, обращенная к глазу, называется глазной. На противоположном конце окуляра располагается полевая (собирающая) линза (рисунок 21).



Рисунок 21 – Окуляр микроскопа.

Линзы окуляра выпуклыми сторонами обращены к исследуемому объекту. Между линзами располагается диафрагма, отсекающая боковые рассеянные лучи и пропускающая центральные (осевые) лучи. Окуляры имеют цифровые обозначения (например, x5, x7, x10, x12, x20), показывающие их собственное увеличение. Общее увеличение микроскопа равно произведению увеличения объектива на увеличение окуляра. Так, при увеличении объектива x8 и окуляра x7 общее увеличение микроскопа равно 56, а при увеличении объектива x90 и окуляра x20 общее увеличение микроскопа составляет 1800.

**Осветительная часть микроскопа** предназначена для оптимального освещения изучаемых объектов. Она состоит из осветителя, зеркала и конденсора. Для освещения исследуемых объектов используют естественный или искусственный свет. Однако интенсивность естественного освещения может меняться в зависимости от времени суток и погоды. Поэтому для освещения чаще используют искусственный свет.

**Типовой осветитель** к микроскопу состоит из лампы накаливания и двухлинзового коллектора. В зависимости от конструкции в состав осветителя могут входить ирисовая диафрагма, блок питания с регулятором освещенности, штатив (рисунок 22).

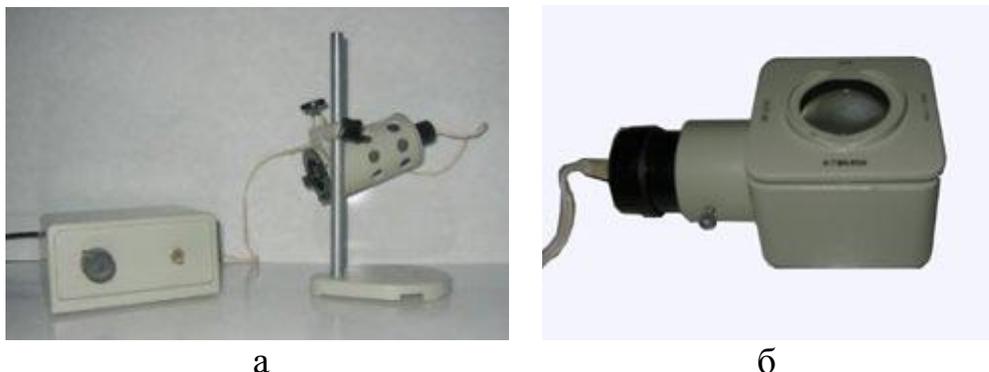


Рисунок 22 - Осветители к световому микроскопу ОИ-19 (а) и ОИ-32 (б).

В современных моделях осветители встроены в основание микроскопа (рисунок 23).

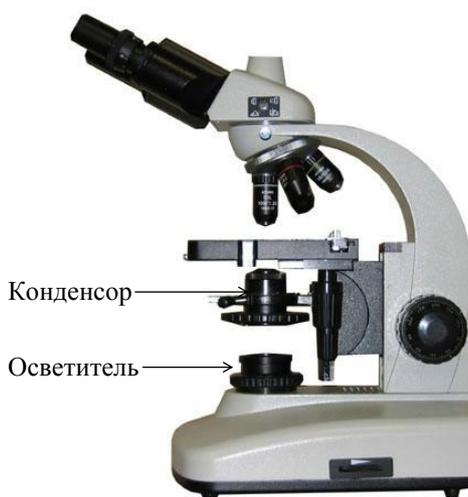


Рисунок 23 – Расположение осветителя в основании микроскопа.

**Зеркало** микроскопа (рисунок 24) предназначено для направления лучей света от осветителя в конденсор.



Рисунок 24 – Зеркало микроскопа.

Одна поверхность зеркала плоская, другая - вогнутая. При естественном освещении используют плоскую поверхность зеркала, при искусственном освещении - вогнутую поверхность зеркала.

**Конденсор** (лат. condense – сгущаю, уплотняю) микроскопа (рисунок 25) собирает и направляет лучи от источника света на изучаемый объект. Он состоит из светофильтра, ирисовой диафрагмы и 2-3 линз.



Рисунок 25 – Конденсор микроскопа (а) и ирисовая диафрагма (б).

**Светофильтр** служит для выделения из видимого света лучей с короткой длиной волны для повышения контрастности изображения.

**Ирисовая диафрагма** находится под конденсором и предназначена для регулирования освещения препарата. Регулировка производится путем сужения или расширения отверстия диафрагмы с помощью специального рычага. Ирисовая диафрагма позволяет направлять на объект только параллельные лучи.

**Ход лучей в световом микроскопе:** от источника света лучи поступают на зеркало, которое направляет их в конденсор. Конденсор фокусирует лучи на изучаемом объекте. Лучи от объекта поступают в объектив, который увеличивает изображение в десятки раз. Затем лучи увеличенного изображения попадают в окуляр, который увеличивает изображение еще в 7-20 раз (рисунок 26).

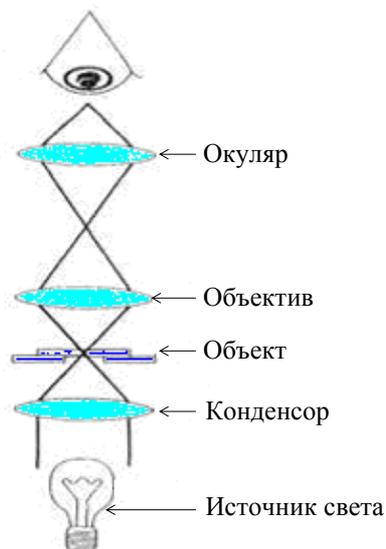


Рисунок 26 – Ход лучей в световом микроскопе.

В итоге получается увеличенное перевернутое изображение. Максимальное увеличение светового микроскопа достигает 3000 раз.

## Разновидности световой микроскопии

В зависимости от способа освещения объекта, используемого объектива, вида лучей и других факторов выделяют следующие разновидности световой микроскопии: светлопольная, иммерсионная, фазово-контрастная, темнопольная, люминесцентная микроскопия.

**Светлопольная микроскопия** (метод светлого поля) представляет собой метод исследования окрашенных клеток и тканей, в котором для освещения объекта применяют лучи видимого спектра. Изображение создается за счет различий в степени поглощения света разными участками изучаемого окрашенного объекта (рисунок 27).

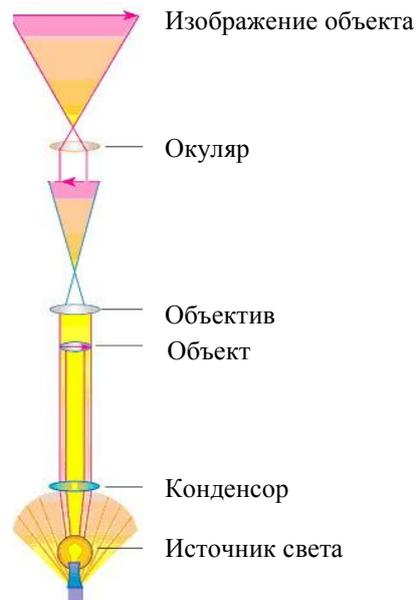


Рисунок 27 – Схема лучей при исследовании объекта в светлом поле зрения.

При прохождении луча через окрашенный объект происходит изменение интенсивности света, то есть изменяется амплитуда световой волны. Такие амплитудные изменения хорошо улавливаются глазом человека.

**Иммерсионная микроскопия** представляет собой метод микроскопического исследования, при котором объектив погружают в жидкость, нанесенную на исследуемый препарат. Используемая при этом жидкость называется иммерсионной. Воздух и стекло имеют разный показатель преломления света (соответственно 1,0 и 1,52), поэтому лучи при переходе из одной среды в другую преломляются и рассеиваются. В результате этого изображение изучаемого объекта искажается. Иммерсионная жидкость имеет коэффициент преломления, близкий коэффициенту преломления стекла (соответственно 1,515 и 1,52), поэтому при иммерсионной микроскопии увеличивается четкость изображения изучаемого объекта и разрешающая способность микроскопа. Ход лучей в сухом и иммерсионном объективах представлен на рисунке 28.

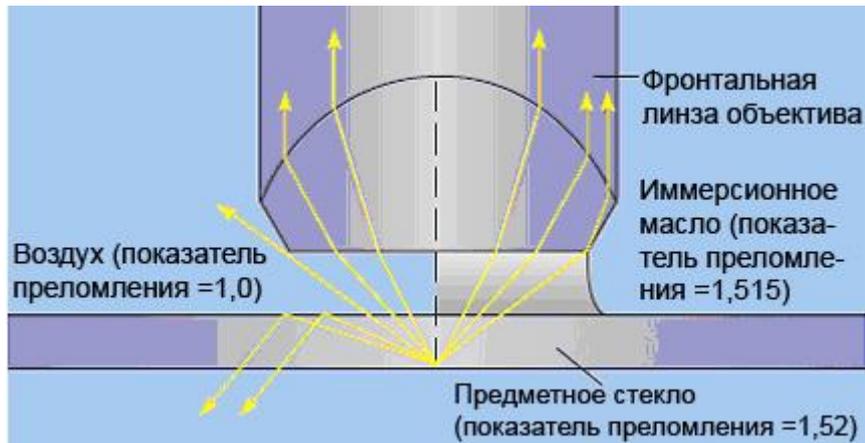


Рисунок 28 – Ход лучей в сухом и иммерсионном объективах.

В качестве иммерсионной жидкости используют кедровое или минеральное масло (показатель преломления 1,515), вазелиновое масло (показатель преломления 1,503), водный раствор глицерина (показатель преломления 1,434), воду (показатель преломления 1,333) или другие синтетические жидкости. Природное кедровое масло в настоящее время практически не используется, так как со временем на воздухе масло уплотняется, а его показатель преломления изменяется. Поэтому чаще применяется синтетическое иммерсионное масло (рисунок 29).



Рисунок 29 – Иммерсионное масло.

Для проведения иммерсионной микроскопии используют специальные иммерсионные объективы. Объективы для масляной иммерсии имеют черную полосу на оправе, а объективы для водной иммерсии – белую полосу.

При работе с иммерсионным объективом предварительно при малом увеличении микроскопа (объектив  $\times 8$ ) и поднятом конденсоре устанавливают освещение. Затем на препарат наносят каплю иммерсионного масла и погружают в нее иммерсионный объектив ( $\times 90$ ). С помощью макрометрического винта производят грубую настройку изображения объекта, а с помощью микрометрического винта – точную настройку изображения. Иммерсионная микроскопия используется в первую очередь при изучении окрашенных препаратов (рисунок 30).

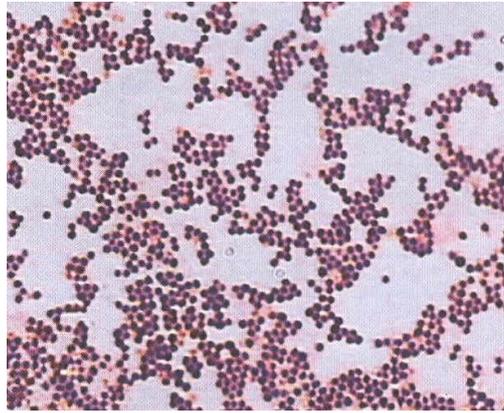


Рисунок 30 – Чистая культура стафилококка, окраска по Граму, иммерсионная микроскопия.

**Фазово-контрастная микроскопия** (метод фазового контраста) представляет собой метод микроскопического исследования малоконтрастных неокрашенных объектов, не видимых при обычной световой микроскопии (например, неокрашенных живых бактерий). При фазово-контрастной микроскопии контрастность изображения достигается сдвигом фаз световой волны. Дело в том, что световые волны, проходя через непрозрачные объекты (фиксированные и окрашенные препараты микробов, срезы тканей), меняют величину амплитуды (интенсивность света). Эти изменения улавливаются человеческим глазом. В то же время, живые клетки микроорганизмов прозрачны и слабо поглощают свет, поэтому они изменяют только фазу проходящих лучей (скорость). Такие фазовые изменения глаз человека не улавливает, поэтому объекты выглядят малоконтрастными. Эти изменения становятся видимыми при использовании фазово-контрастной микроскопии, при которой фазовые изменения преобразуются в амплитудные. Таким образом, фазово-контрастная микроскопия позволяет преобразовать малоконтрастное изображение различающихся по плотности структур в контрастное и отчетливое изображение.

Для фазово-контрастной микроскопии используют специальное устройство, состоящее из фазового конденсора, фазовых объективов, вспомогательного микроскопа и светофильтров. В фазовом конденсоре располагается кольцевая диафрагма, имеющая прозрачное световое кольцо. В свою очередь фазовый объектив имеет внутри фазовую пластинку с нанесенным кольцом (фазовым кольцом). Размер светового кольца конденсора должен соответствовать размеру фазового кольца объектива.

При фазово-контрастной микроскопии пучок света проходит через кольцо диафрагмы конденсора и объект, а затем попадает в кольцо фазовой пластинки объектива (рисунок 31).

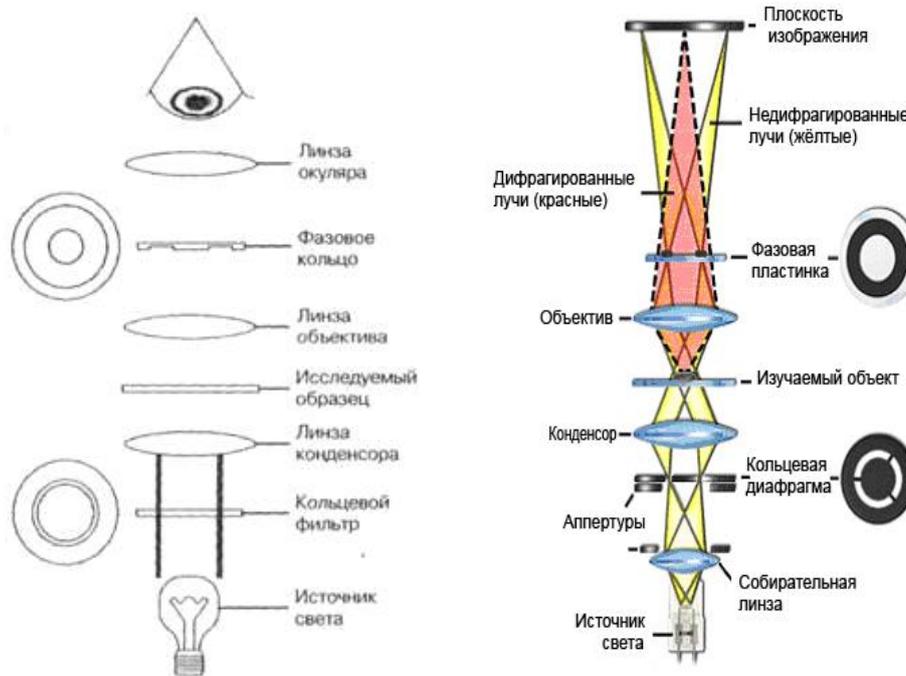


Рисунок 31 – Схема фазово-контрастного микроскопа и ход лучей в фазово-контрастном микроскопе.

Свет, прошедший через участок препарата, где нет изучаемого объекта, в последующем проходит через фазовое кольцо объектива и формирует светлое изображение фона. Свет, прошедший через изучаемый объект, изменяет фазу и разделяется на недифрагированные и дифрагированные лучи. Недифрагированные лучи, проходя через фазовую пластинку объектива, получают дополнительный сдвиг фазы. Дифрагированные лучи проходят мимо фазовой пластинки и не изменяют фазы. В окуляре происходит наложение дифрагированных и недифрагированных лучей, в результате чего исследуемый объект (микробная клетка) будет выглядеть темным на светлом фоне. Следовательно, фазовая пластинка преобразует фазовые изменения в амплитудные изменения (изменения интенсивности света). Получаемое при этом изображение называется фазово-контрастным. Фазовое кольцо объектива получают путем травления или путем нанесения на стекло тонкой пленки кобальта или меди. В первом случае изображение объекта выглядит темным на светлом фоне (позитивный фазовый контраст, рисунок 32). Во втором случае изображение объекта выглядит светлее окружающего темного фона (негативный фазовый контраст).



Рисунок 32 – Фазово-контрастная микроскопия *Bacillus cereus*.

Негативный фазовый контраст используется в так называемом аноптральном микроскопе. **Аноптральная микроскопия** была разработана в 1953 г. финским физиологом А. Вильска. Этот метод представляет собой усовершенствованную фазово-контрастную микроскопию: на одной из линз объектива нанесено кольцо сажи, а на линзе конденсора – прозрачное кольцо. При использовании такого объектива исследуемый объект получается светлее темного фона. Следовательно, аноптральная микроскопия позволяет получить более контрастное изображение по сравнению с фазово-контрастной микроскопией. Ход лучей в аноптральном микроскопе представлен на рисунке 33.

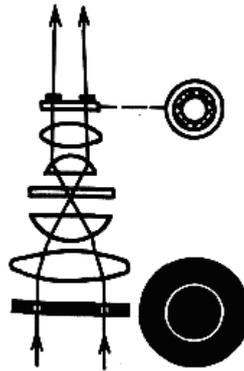


Рисунок 33 – Ход лучей в аноптральном микроскопе.

Приспособление для фазово-контрастной микроскопии можно применять в обычном микроскопе. Для этого обычный конденсор заменяется фазовым, а объективы микроскопа - на фазовые объективы (рисунок 34).



Рисунок 34 – Фазово-контрастные устройства ФКУ-2 (а) и КФ-4 (б).

Фазовый конденсор помещается в кольцо кронштейна вместо обычного конденсора и зажимается винтом. Фазовый конденсор может использоваться для наблюдения обычным способом. Для этого под револьверным диском располагается ирисовая диафрагма, а в револьверном диске имеется свободное отверстие для прохождения всего пучка света.

При **темнопольной микроскопии** (при использовании метода темного поля) объект освещается сбоку, поэтому исследователем воспринимаются отраженные

лучи. При темнопольной микроскопии можно обнаружить частицы, которые при светлопольной микроскопии не видны. В основе темнопольной микроскопии лежит эффект Тиндаля – рассеивание света при прохождении светового пучка через оптически неоднородную среду. Для достижения эффекта Тиндаля используют специальный темнопольный конденсор, который устанавливают на место обычного конденсора. В темнопольном конденсоре внутренняя боковая поверхность зеркальная. Эффект Тиндаля достигается также использованием темнопольного фильтра, представляющего собой кружок черной бумаги, помещенной между линзами конденсора в центральной части так, чтобы только незначительная периферическая часть линзы оставалась свободной. При темнопольной микроскопии в объектив попадает незначительная часть лучей, прошедших через темнопольный фильтр и отраженных объектом.

При темнопольной микроскопии разрешающая способность микроскопа возрастает. Схема темнопольного микроскопа и ход лучей при темнопольной микроскопии представлены на рисунке 35.

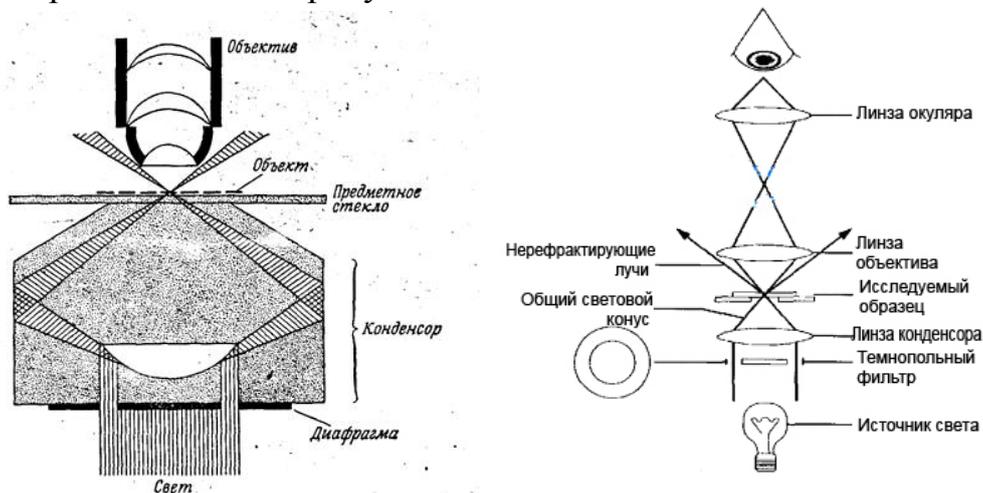


Рисунок 35 – Схема темнопольного микроскопа и ход лучей в темнопольном микроскопе.

При темнопольной микроскопии изучают движение живых неокрашенных бактерий, например, спирихет. Препарат для темнопольной микроскопии готовят методом “раздавленная” или “висячая” капля. Неосвещенное поле зрения остается темным, а бактерии выглядят ярко светящимися (рисунок 36).

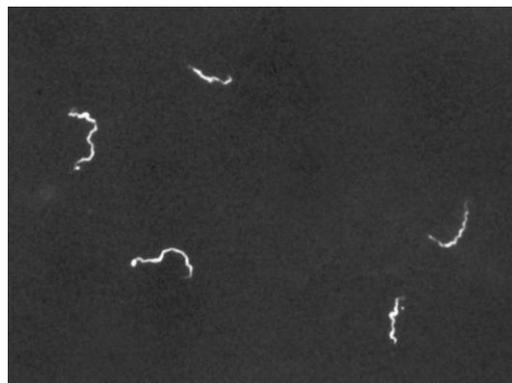


Рисунок 36 – *Treponema pallidum* при исследовании методом темнопольной микроскопии.

При темнопольной микроскопии можно увидеть только контуры объекта, но невозможно изучить их внутреннюю структуру.

**Люминесцентная (флюоресцентная) микроскопия** основана на явлении люминесценции (флюоресценции). Люминесценция (*luminis* - свет, *scentic* - способность светиться) представляет собой способность объекта под влиянием падающего света (синие-фиолетового света или ультрафиолетовых лучей) испускать лучи с большей длиной волны и другого цвета. При люминесцентной микроскопии используют как естественную (первичную, собственную) люминесценцию микробов, так и искусственную (вторичную, наведенную) люминесценцию. Собственная люминесценция наблюдается без предварительного окрашивания изучаемого объекта специальными красителями. Большинство биологических объектов имеют неяркую собственную люминесценцию, поэтому для их изучения используют вторичную люминесценцию.

Вторичная люминесценция возникает после окраски препарата специальными люминесцирующими красителями (флюорохромами, люминофорами), которые способны связываться со специфическими структурами бактериальных клеток. Например, акридиновый оранжевый связывается с нуклеопротеидами клетки, аурамин – с воскоподобными веществами. Поэтому акридиновый оранжевый применяют для выявления нуклеиновых кислот, мукополисахаридов, для обнаружения гонококков, аурамин – кислотоустойчивых бактерий (например, микобактерий туберкулеза), корифосфин – коринебактерий дифтерии, бензпирен и родамин – липидов.

Схема и внешний вид люминесцентного микроскопа представлены на рисунке 37.

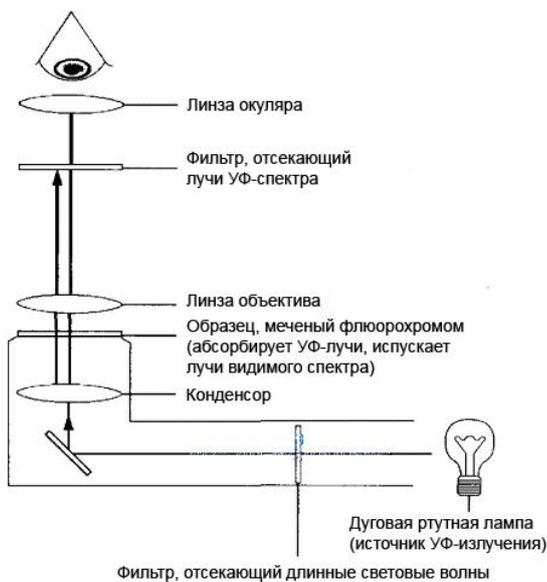


Рисунок 37 – Схема и внешний вид люминесцентного микроскопа.

В качестве осветителя в люминесцентном микроскопе применяют ртутную лампу, испускающую ультрафиолетовое излучение. Объективы для люминесцентных исследований имеют маркировку FLUOR.

В люминесцентном микроскопе имеется система светофильтров, пропускающих определенные лучи и задерживающих остальные. Первый (возбуждающий) светофильтр помещают перед конденсором. Он пропускает от источника УФ-излучения (ртутно-кварцевой лампы) только те лучи, которые возбуждают люминесценцию (сине-фиолетовые или ультрафиолетовые лучи). Второй (пропускающий) светофильтр устанавливают после объектива (в тубусе или в окуляре). Он поглощает возбуждающие лучи (сине-фиолетовые или ультрафиолетовые) и пропускает только свет люминесценции изучаемого объекта (рисунок 38).

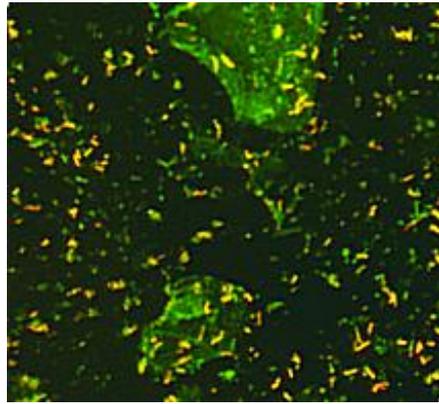


Рисунок 38 – Люминесцентная микроскопия микобактерий туберкулеза (палочки желтого цвета).

В последние годы особенно широко используется **иммунолюминесцентная микроскопия** – реакция иммунофлюоресценции (РИФ) с применением специфичных иммуноглобулинов, меченых флюорохромами. В качестве метки чаще всего используют флуоросцеина изотиоцианат (ФИТЦ). Комплекс “антитело + ФИТЦ” позволяет выявлять в РИФ очень низкие концентрации антигенов, в том числе клетки бактерий (рисунок 39).

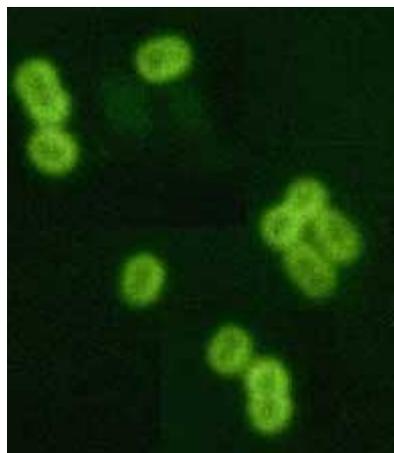


Рисунок 39 – Выявление пневмококков с помощью РИФ.

Преимуществами люминесцентной микроскопии являются цветное изображение изучаемого объекта, выявление в исследуемом материале микроорганизмов в небольшой концентрации, возможность использования в качестве экспресс-метода обнаружения и идентификации антигенов.

### **Правила обращения со световым микроскопом**

Для нормальной работы светового микроскопа необходимо выполнять следующие требования:

1. Хранить микроскоп в шкафу или под колпаком для предотвращения запыления линз окуляра, объективов, конденсора и других частей микроскопа.
2. Извлекать микроскоп из шкафа двумя руками, держа за штатив и основание.
3. Не касаться пальцами оптических поверхностей.
4. Очищать линзы от пыли хлопчатобумажной тканью, не оставляющей волосков. Иммерсионное масло удалять с линз объектива салфеткой, смоченной бензином, ксилолом или толуолом. Эфир, ацетон и спирт растворяют клей между линзами и нарушают качество изображения.
5. Регулярно чистить предметный столик.
6. Устанавливать микроскоп для работы недалеко от края стола.
7. После завершения работы убирают препарат, протирают объектив, на предметный столик помещают салфетку револьвер устанавливают в нейтральное положение, тубус и конденсор опускают, микроскоп помещают в шкаф или под колпак.

### **Электронная микроскопия**

Электронная микроскопия используется для изучения субклеточных структур микроорганизмов. В электронном микроскопе освещение исследуемых объектов проводится не световыми лучами, а потоком электронов. Источником электронов в электронном микроскопе является электронная пушка (вольфрамовая нить, нагреваемая электрическим током). В качестве линз в электронном микроскопе используются электромагниты. Выходящий из электронной пушки пучок электронов движется в вакууме под влиянием электромагнитного поля. Конденсорная линза направляет пучок электронов на объект, а увеличивающие линзы создают увеличенное изображение, выводящееся на экран. Разрешающая способность современных электронных микроскопов составляет менее 1 ангстрема ( $10^{-10}$  м).

Целые бактериальные клетки непроницаемы для электронов. Для их исследования в электронном микроскопе используют срезы бактерий толщиной 20-100 нм (1 нанометр равен  $10^{-9}$  м). Такие ультратонкие срезы получают путем заливки исследуемого материала в эпоксидные смолы и разрезания полученных блоков на специальных микротоммах (рисунок 40).



Рисунок 40 – Микротом Microm HM 200.

Для повышения контрастности изображения объекта при электронной микроскопии используют различные способы контрастирования. Наиболее распространенной является обработка клеток солями тяжелых металлов (хрома, свинца, вольфрама и др.). Структуры клеток, поглотившие эти металлы, выглядят темными и контрастными.

Выделяют два основных вида электронных микроскопов: просвечивающие (ПЭМ) и сканирующие (СЭМ). В **просвечивающем (трансмиссионном) электронном микроскопе** электронный пучок проходит через ультратонкий образец так, что часть электронов рассеивается на образце, а часть – нет. Затем через систему магнитных (увеличивающих) линз на люминесцентном экране создается плоскостное изображение о структуре образца (рисунок 41).

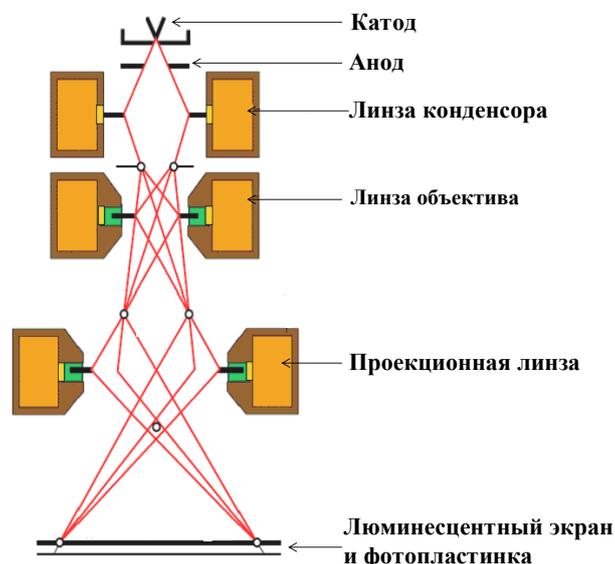


Рисунок 41 – Схема просвечивающего электронного микроскопа.

Изображение на экране создает та часть электронов, которая проходит через исследуемый объект. Участки клеток, слабо рассеивающие электроны, на экране выглядят светлыми, а участки клеток, сильно рассеивающие электроны, на экране будут темными (рисунок 42).

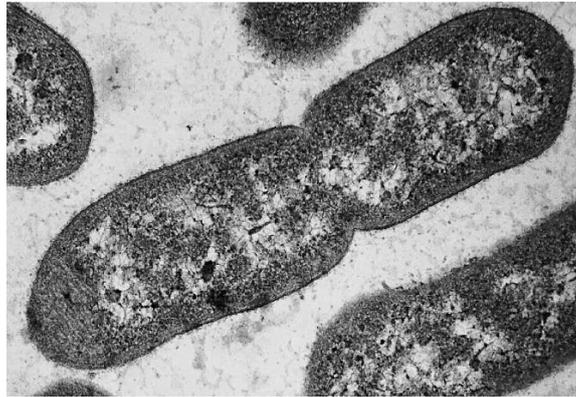


Рисунок 42 – Просвечивающая электронная микроскопия клеток *Bacteroides fragilis*.

Внешний вид просвечивающего (трансмиссионного) электронного микроскопа представлен на рисунке 43.



Рисунок 43 – Просвечивающий электронный микроскоп JEM-2100F.

Порядок приготовления образцов для просвечивающей электронной микроскопии:

- химическая фиксация образца альдегидами и четырехокисью осмия;
- обезвоживание образца в органическом растворителе (спирте или ацетоне);
- пропитывание образца эпоксидными смолами;
- разрезание образца на ультрамикротомах;
- размещение образцов на специальных сетках и их контрастирование солями тяжелых металлов.

Устройство **сканирующего (растрового) электронного микроскопа** основано на принципе прохождения пучка электронов по поверхности образца. В сканирующем электронном микроскопе пучок электронов собирается в тонкий луч, которым сканируют образец. Отраженные от поверхности образца электроны собираются и формируют на экране объемное изображение (рисунок 44).

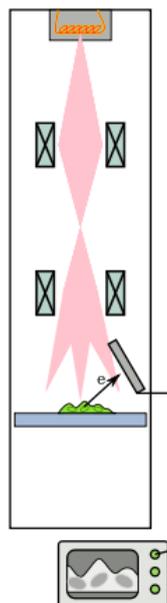


Рисунок 44 – Схема сканирующего электронного микроскопа.

При сканирующей электронной микроскопии на поверхность изучаемых объектов в вакуумной камере напыляют электронно-плотные вещества. В результате этого при сканирующей электронной микроскопии формируется трехмерное изображение (рисунок 45).

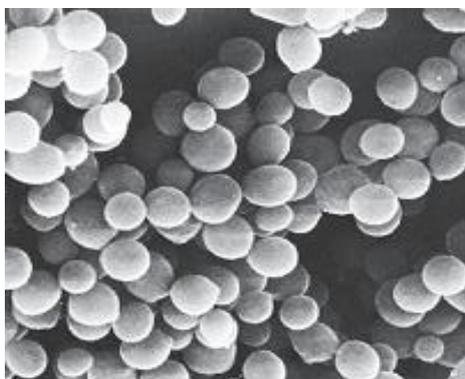


Рисунок 45 – Сканирующая электронная микроскопия *Staphylococcus aureus*.

На рисунке 46 представлен внешний вид одного из современных сканирующих электронных микроскопов.



Рисунок 46 – Сканирующий электронный микроскоп JSM-7600F.

Главным преимуществом электронной микроскопии является его высокая разрешающая способность, позволяющая изучать ультраструктуру бактерий, строение вирусов и макромолекул. В настоящее время электронная микроскопия широко используется в сочетании с другими методами исследований – гистохимическими, иммунологическими (рисунок 47).

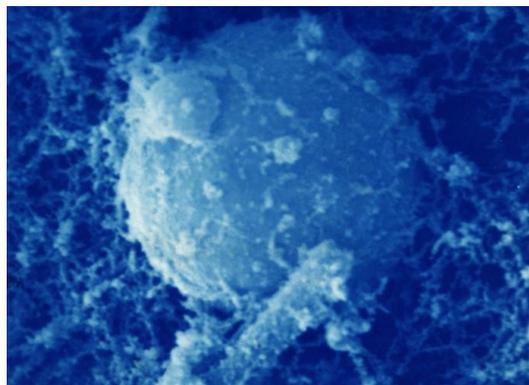


Рисунок 47 – Сканирующая электронная микроскопия фагоцита, поглощающего бактериальную клетку.

Такие исследования позволяют изучать не только структуру бактерий, но и механизмы развития инфекции.

### **Оборудование рабочего места для микроскопирования**

Для приготовления препарата для микроскопирования в бактериологической лаборатории оборудуют рабочее место, на котором размещают штатив для пробирок, спиртовку, спички, предметные и покровные стекла в склянке со спиртом, бактериологическую петлю, емкость с дезраствором, бутылку с сифоном и с дистиллированной водой для промывания препаратов, мостик, чашка для окраски

препаратов и сбора мусора (кристаллизатор), емкости с красителями и фиксирующими жидкостями, карандаши и другие необходимые материалы (рисунок 48).



Рисунок 48 – Оборудование рабочего места для микроскопирования.

Приспособления, используемые при оборудовании рабочего места для приготовления микроскопических препаратов, представлены на рисунках 49-52.

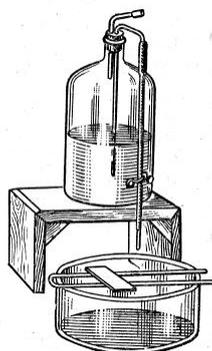


Рисунок 49 – Приспособление для окраски и промывания препаратов.

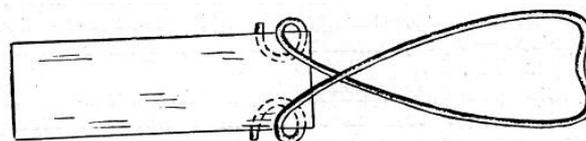


Рисунок 50 – Пружинный зажим для предметных стекол.

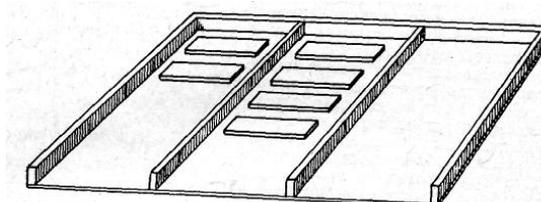


Рисунок 51 – Подставка для предметных стекол.

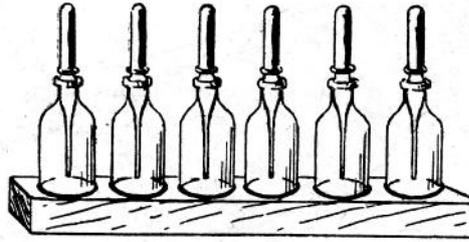


Рисунок 52 – Емкости с пипетками для растворов красок.

Вместо пружинного зажима для предметных стекол используется также анатомический пинцет. В настоящее время растворы красителей выпускаются в виде рабочих растворов в полиэтиленовых флаконах.

### **Подготовка предметных стекол для микроскопического исследования**

С помощью микроскопии изучают морфологические (форма и размер клеток) и тинкториальные (отношение к красителям) свойства бактерий. Микроскопическому исследованию подвергают препараты, приготовленные из живых или убитых (фиксированных и окрашенных) бактерий. В качестве исследуемого материала используют кровь, мокроту, гной, фекалии и другой инфицированный материал от больного, а также чистую культуру бактерий, выросшую на питательных средах. Из этих материалов готовят препарат – мазок. Из пораженных органов и тканей можно приготовить мазок-отпечаток. Для приготовления препаратов используют предметные стекла. Для длительного сохранения окрашенных препаратов и при приготовлении препаратов “раздавленная капля” используют покровные стекла.

**Подготовка предметных и покровных стекол.** Предметные и покровные стекла для микроскопических исследований должны быть чистыми и хорошо обезжиренными. Доказательством хорошего обезжиривания стекла является равномерное распределение капли жидкости на его поверхности. Подготовленные стекла хранят в банке с притертой пробкой в сухом виде либо в спирте или в смеси Никифорова – смеси спирта с эфиром в соотношении 1:1. Перед приготовлением препарата стекло фламбируют (прожигают в пламени спиртовки).

Новые не бывшие в употреблении стекла вначале моют в воде, затем выдерживают в смеси спирта с эфиром (1:1). Новые стекла можно также кипятить в течение 10 минут в 1% растворе натрия гидрокарбоната (соды) с последующим промыванием в дистиллированной воде.

Бывшие в употреблении стекла погружают на 1-2 часа в концентрированную серную кислоту или в смесь серной кислоты с калием двуххромовокислым (хромовую смесь). После этого стекла промывают в проточной воде и кипятят в 5% растворе натрия гидрокарбоната в течение 30 минут. После ополаскивания в чистой воде их высушивают в сушильном шкафу или при комнатной температуре.

## Приготовление препаратов для микроскопирования микробов в живом состоянии

Препараты живых микробов используют для изучения размеров, формы клеток, их подвижности и других признаков. Микробы в этих препаратах находятся в естественном, неизменном состоянии. Изучение микробов в живом состоянии позволяет выявить ряд свойств, не обнаруживаемых у фиксированных микробов, в частности, подвижность бактерий.

Микроскопирование микробов в живом состоянии имеет такие недостатки как низкая контрастность живых клеток и невозможность длительного наблюдения за микробной клеткой в связи с ее быстрым перемещением в поле зрения в результате активной подвижности некоторых бактерий или в связи с броуновским движением жидкости. Поэтому микроскопирование микробов в живом состоянии позволяет получить только общее представление о морфологии бактерий. После завершения микроскопирования живых патогенных бактерий препарат обязательно погружают в емкость с дезинфицирующим раствором.

Для микроскопического исследования бактерий в живом состоянии используют препараты “раздавленной капли” или “висячей капли”. Микроскопирование таких препаратов лучше осуществлять в темном поле.

**Препарат “раздавленная капля”** готовится следующим образом. На середину сухого предметного стекла с соблюдением правил асептики наносят бактериологической петлей или пастеровской пипеткой каплю дистиллированной воды или физиологического раствора. В эту каплю бактериологической петлей вносят культуру бактерий и тщательно перемешивают до однородного состояния. Жидкую культуру наносят на стекло пастеровской пипеткой. Каплю осторожно накрывают чистым покровным стеклом: краем покровного стекла прикасаются к поверхности предметного стекла рядом с каплей, наклоняют покровное стекло над каплей и опускают его. При приготовлении препарата следят за тем, чтобы в суспензии не образовались пузырьки воздуха. Правильно приготовленная “раздавленная капля” заполняет все пространство между покровным и предметным стеклом, при этом жидкость не должна выступать за края покровного стекла. Излишки жидкости убирают полоской фильтровальной бумаги. После исследования препарат помещают в емкость с дезраствором. Иногда этот препарат называют препаратом “придавленная капля”. Если требуется рассматривать препарат продолжительное время, то края покровного стекла предварительно смазывают вазелином (рисунок 53).

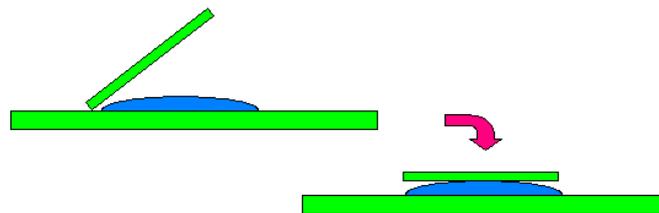


Рисунок 53 – Порядок приготовления препарата “раздавленная капля”.

**Препарат “висячая капля”.** Для длительного (в течение 1-2 суток) изучения живых микробов готовят препарат “висячая капля”, в котором предотвращают высыхание препарата путем размещения капли в герметичной камере. Для приготовления такого препарата используют специальное предметное стекло с лункой. На середину покровного стекла наносят каплю жидкой культуры микроба. Края лунки предметного стекла смазывают вазелином. Предметное стекло переворачивают лункой вниз, слегка прижимают его к покровному стеклу так, чтобы капля оказалась в центре лунки, а лунка герметично закрылась покровным стеклом. После этого препарат переворачивают. Капля должна свободно свисать в лунку, не соприкасаясь с его дном и краями (рисунок 54).

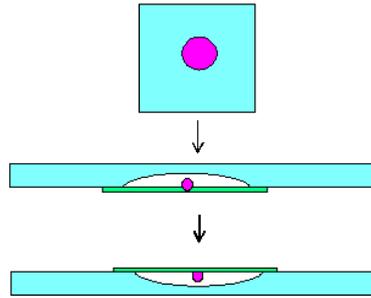


Рисунок 54 – Порядок приготовления препарата “висячая капля”.

С помощью препарата “висячая капля” можно изучать процесс размножения бактерий, спорообразование и другие свойства живых микробов. Для увеличения контрастности изучаемых объектов препарат исследуют в слегка затемненном поле. Для этого сужают диафрагму конденсора. После микроскопического исследования препараты живых бактерий помещают в емкость с дезраствором.

### **Приготовление препаратов для микроскопирования микробов в окрашенном состоянии**

Этапы приготовления препаратов окрашенных микробов:

1. Приготовление мазка на предметном стекле.
2. Высушивание мазка.
3. Фиксация препарата.
4. Окрашивание мазка.
5. Высушивание препарата.

**Приготовление препарата из культуры с плотной питательной среды.** На середину чистого предметного стекла наносят каплю стерильной дистиллированной воды или физраствора. В пламени спиртовки прожигают бактериологическую петлю, охлаждают ее и отбирают немного материала с питательной среды. При отборе материала пробирку держат в левой руке сверху между большим и указательным пальцами, а пробку извлекают в пламени горелки мизинцем правой руки. При отборе материала с агара в чашке Петри чашку размещают рядом с горячей спиртовкой, приподнимают крышку левой рукой и отбирают материал петлей. После отбора материал переносят в каплю жидкости на стекле, тщательно круговыми движениями перемешивают и распределяют по площади не менее 1 см<sup>2</sup>.

После приготовления препарата петлю сразу же фламбируют в пламени горелки и помещают в штатив. Препарат высушивают на воздухе.

**Приготовление препарата из жидкой микробной культуры.** В этом случае бактериологическую петлю прожигают на пламени горелки, остужают и каплю материала наносят на поверхность стекла. Отбор материала из пробирки производят указанным выше способом при соблюдении правил асептики. Круговыми движениями каплю материала распределяют по стеклу на площади не менее  $1 \text{ см}^2$ . После приготовления препарата петлю фламбируют в пламени горелки и помещают в штатив, а приготовленный препарат высушивают на воздухе.

Для приготовления препарата из жидкой микробной культуры можно использовать пастеровскую пипетку, которую после нанесения капли на стекло помещают в емкость с дезинфицирующим раствором.

Порядок приготовления препарата из микробной культуры в пробирке представлен на рисунке 55.

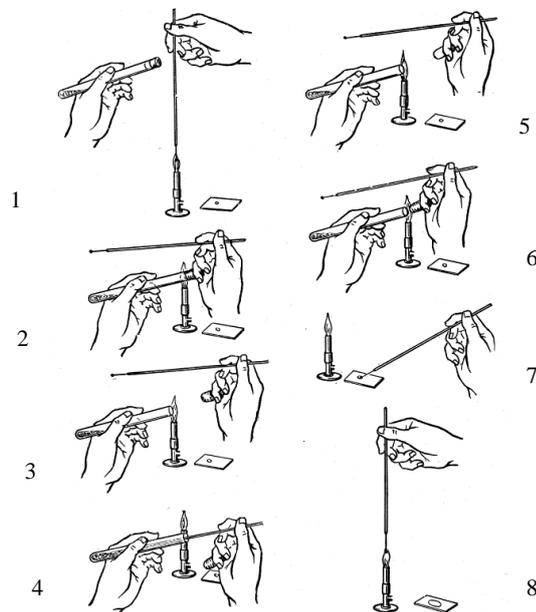


Рисунок 55 – Схема приготовления препарата – мазка из микробной культуры из пробирки. Цифры указывают последовательность выполнения операций.

Правильно приготовленный мазок должен быть тонким, иметь круглую или овальную форму, быть размером  $1-2 \text{ см}^2$ , материал в нем должен быть распределен равномерно.

**Приготовление препарата - мазка из мокроты и гноя.** Бактериологическую петлю фламбируют в пламени спиртовки и остужают. Стерильной петлей исследуемый материал наносят на середину предметного стекла и плотно прижимают его другим предметным стеклом. Предметные стекла раздвигают в разные стороны за свободные концы. В результате этого получают два препарата - мазка (рисунок 56).

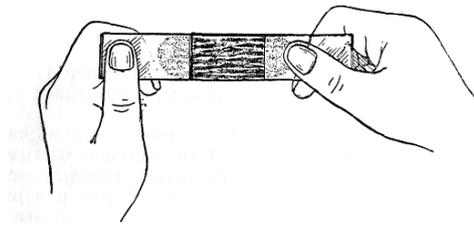


Рисунок 56 – Приготовление препарата - мазка из мокроты и гноя.

**Приготовление препарата - мазка из крови.** Место взятия крови протирают этиловым спиртом. Затем производят укол. Предметным стеклом прикасаются к капле крови, выступающей при уколе. Стекло с каплей крови кладут на горизонтальную поверхность и придерживают левой рукой; а правой рукой к капле придвигают под углом в  $45^\circ$  шлифованное стекло. Капля крови должна равномерно растекаться по краю шлифованного стекла. Плотнo прижимая и не меняя угла наклона, шлифованное стекло продвигают по предметному стеклу. В результате этого на предметном стекле получается равномерный мазок (рисунок 57).

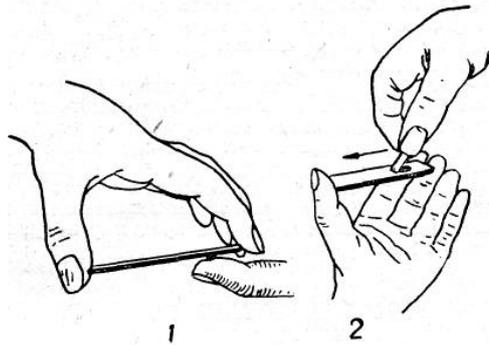


Рисунок 57 - Приготовление мазка крови: 1 – взятие капли крови на предметное стекло; 2 – приготовление мазка крови с помощью шлифованного стекла.

**Приготовление мазка – отпечатка тканей.** При исследовании патологического или трупного материала (ткань, орган) ножницы смачивают в этиловом спирте, обжигают на пламени горелки, остужают и срезают кусочек исследуемой ткани (органа). К срезу ткани плотно прижимают предметное стекло. В результате этого на стекле остается мазок – отпечаток.

**Высушивание мазков.** Приготовленные препараты чаще всего высушивают на воздухе при комнатной температуре. Для ускорения высыхания препарат осторожно подогревают в струе теплого воздуха высоко над пламенем горелки или в термостате при температуре  $36-38^\circ\text{C}$ . Правильно высушенный препарат имеет вид сплошного белого налета на поверхности предметного стекла.

**Фиксация препарата.** Высушенный препарат фиксируют, то есть закрепляют на предметном стекле. При фиксации происходит также инаktivация микробов. Фиксацию проводят с помощью физического или химического способа.

**Физический способ фиксации препарата.** Высушенный препарат медленно проводят 2-3 раза через верхнюю часть пламени горелки. Затем препарат остужают на воздухе (рисунок 58).



Рисунок 58 – Фиксация препарата пламенем.

**Химический способ фиксации препарата.** Высушенный препарат помещают в стаканчик с фиксирующей жидкостью или 1-2 капли фиксирующей жидкости наносят на препарат. Экспозиция - 3-5 минут. В качестве фиксирующих химических средств чаще всего используют эфир, этиловый или метиловый спирт, смесь спирта с эфиром (смесь Никифорова) в соотношении 1:1. После фиксации препарат промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой.

После фиксации с обратной стороны мазка восковым карандашом или маркером обводят границу (зону) препарата, чтобы после окраски точно знать место его нахождения. Фиксированные и окрашенные препараты микробов не опасны, сохраняются без изменений в течение нескольких недель.

**Окрашивание мазка.** Препараты для микроскопирования окрашивают органическими красителями. Красители поступают в продажу в виде сухих порошков. В лаборатории сначала готовят насыщенные спиртовые растворы красителей, а потом из насыщенных растворов готовят разведенные (рабочие) растворы. В настоящее время в продажу поступают также готовые разведенные растворы красок для окрашивания микробов тем или иным способом.

При окрашивании мазка достаточно несколько капель краски, которые наносятся на мазок при помощи пипетки или капельницы. По истечении времени окрашивания краску сливают, а препарат промывают водой. Остатки воды удаляют с помощью фильтровальной бумаги. Досушивают препарат на воздухе. Для микроскопирования используют совершенно сухой мазок, так как остатки воды образуют с иммерсионным маслом мутную эмульсию, затрудняющую исследование препарата.

#### **Порядок микроскопирования:**

1. Зеркало микроскопа устанавливают в соответствии с освещением (естественное или искусственное) и под малым увеличением (объектив х40, окуляр х7) и поднятом конденсоре регулируют освещенность поля зрения.

2. На окрашенный препарат капают каплю иммерсионного масла и препарат устанавливают на предметный столик микроскопа (при необходимости препарат закрепляют держателями).

3. Обычный объектив микроскопа заменяют на иммерсионный (х90).

4. Наблюдая сбоку, с помощью макрометрического винта осторожно опускают тубус до соприкосновения иммерсионного объектива с маслом.

5. Наблюдая в окуляр и осторожно поворачивая макрометрический винт, определяют контуры микробных клеток и с помощью микрометрического винта добиваются их ясного изображения. Изучают препарат.

6. Поднимают тубус и убирают препарат с предметного столика. Объектив протирают мягкой салфеткой, смоченной бензином.

7. Револьвер устанавливают в нейтральное положение, подкладывают под него салфетку, опускают револьвер и конденсор.

**Красители.** В микробиологической практике для окрашивания микробов используют кислотные (кислые, протоплазматические), нейтральные и щелочные (основные, ядерные) органические красители.

Из **кислых красителей** используют:

- **красные красители:** фуксин кислый, эозин, эритрозин, конго красный;
- **желтые красители:** пикриновая кислота, конго;
- **черные красители:** нигрозин.

Из **основных красителей** чаще применяют:

- **красные красители:** фуксин основной феноловый, сафранин, нейтральный красный, пиронин;
- **фиолетовые красители:** метиловый фиолетовый, генциановый фиолетовый (генциан виолет), кристаллический фиолетовый;
- **синие красители:** метиленовый синий, метиленовый голубой, азур II, виктория;
- **зеленые красители:** малахитовый зеленый, метиленовый зеленый;
- **желто-коричневые красители:** везувин, хризоидин.

В работе используют как спиртовые, так и водные растворы красителей. Спиртовые растворы красителей более устойчивы. Их готовят заранее, заливая сухой краситель этиловым спиртом (96%) в соотношении 1:10. Насыщенные растворы красителей хранят в банках с притертыми пробками. Водные растворы красителей являются нестойкими и окрашивают клетки медленно. Для усиления действия красителя к нему добавляют протравляющее вещество, которое способствует разрыхлению клеточной оболочки и лучшему прокрашиванию микробов. В качестве протравляющих веществ используют формалин, фенол, щелочи. Рецепты приготовления растворов наиболее часто используемых красителей представлены в приложении 1 к данному разделу.

При окрашивании микробов в зависимости от числа применяемых красителей используют простые и сложные (дифференциальные) методы. В простых методах применяют один краситель, в сложных – несколько красителей. Простое окрашивание позволяет судить о величине, форме и взаимном расположении микробных клеток. При этом клетка окрашивается в один цвет, но разные структуры клетки могут окрашиваться с разной интенсивностью. При сложных методах окрашивания разные клеточные структуры окрашиваются в разные цвета, что позволяет судить о структурных особенностях микробов.

**Простой метод окрашивания.** При простом окрашивании чаще всего используют фуксин Пфейффера или метиленовую синьку по Лёффлеру. Приготовленный и фиксированный препарат окрашивают фуксином в течение 1-2 минут, а метиленовой синькой – в течение 3-5 минут. При простом окрашивании на фиксированный препарат наносят 1-2 капли раствора красителя и выдерживают

требуемое время. Окрашивание препарата можно также производить в емкости с раствором красителя или с помощью полоски фильтровальной бумаги, которую помещают на препарат и смачивают 2 каплями раствора красителя. При этом добиваются плотного прилегания бумаги к поверхности стекла. Для окрашивания можно использовать также полоску фильтровальной бумаги, предварительно пропитанную красителем и высушенную. Такую полоску бумаги накладывают на препарат, наносят на нее несколько капель дистиллированной воды и выдерживают необходимое для окрашивания время. По истечении времени окрашивания избыток красителя сливают (убирают полоску бумаги), препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют.

**Сложные методы окрашивания** применяются для детального изучения структуры бактериальной клетки. При сложных методах окрашивания используют несколько красителей. В лабораторной практике из сложных методов окрашивания наиболее часто применяют методы Грама (идентификация грамположительных и грамотрицательных бактерий), Циля-Нельсена (окрашивание кислотоустойчивых бактерий), Бурри-Гинса (выявление капсулы), Ожешко (окрашивание спор) и некоторые другие. Сложные методы окрашивания микробов представлены в приложении 2 к настоящему разделу.

**Метод Грама** является самым универсальным сложным методом окрашивания бактерий. Все бактерии при окрашивании по Граму распределяются на две группы: грамположительные (грамположительные) и грамотрицательные (грамнегативные). Грамположительные микробы окрашиваются в фиолетовый (синий) цвет, грамотрицательные - в красный (розовый) цвет (рисунок 59).

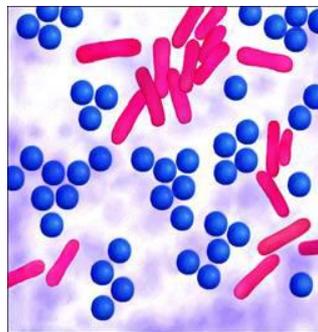


Рисунок 59 – Грамположительные кокки (синие) и грамотрицательные палочки (розовые).

Отношение к окраске по Граму является важным тинкториальным признаком, который учитывается при идентификации бактерий.

**Методика окрашивания бактерий по Граму** (рисунок 60):

1. На фиксированный препарат наносят несколько капель раствора генцианового фиолетового или помещают полоску фильтровальной бумаги, на которую наливают раствор красителя. Краситель выдерживают в течение 1-2 минут, после чего избыток красителя сливают или снимают фильтровальную бумагу.

2. Не промывая препарата, наносят несколько капель раствора Люголя и выдерживают в течение 1-2 минут до почернения препарата. Избыток красителя сливают.

3. На препарат наносят несколько капель этилового спирта (96%) и выдерживают в течение 30 секунд. После этого спирт сливают, препарат промывают водой, избыток воды сливают.

4. На препарат наносят несколько капель раствора фуксина и выдерживают в течение 1-2 минут. Избыток красителя смывают водой.

5. Препарат высушивают фильтровальной бумагой и досушивают на воздухе.

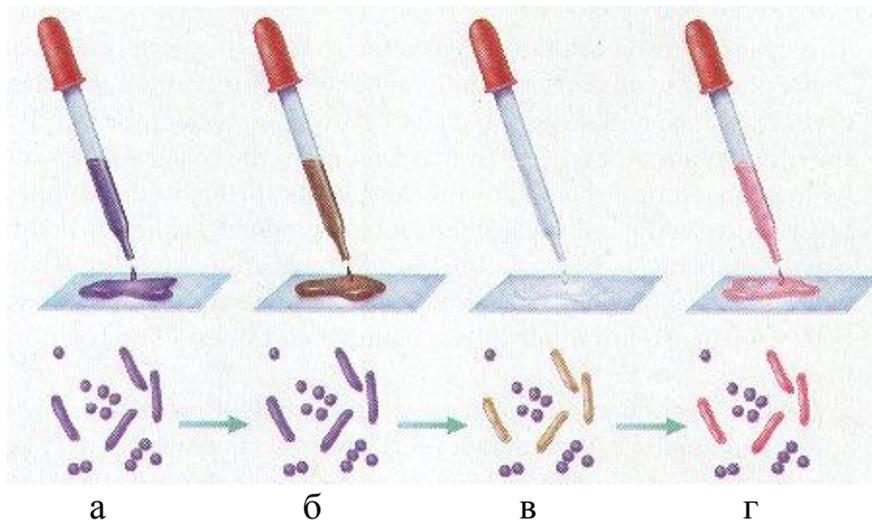


Рисунок 60 – Порядок окраски по Граму: а – окраска генциановым фиолетовым; б – окраска раствором Люголя; в – обесцвечивание спиртом; г – окраска фуксином.

После высушивания препарат микроскопируют с иммерсионной системой.

**Метод Грама в модификации А.В. Синева** предусматривает использование фильтровальной бумаги, пропитанной генциановым фиолетовым, приготовленным по следующему рецепту: генциановый фиолетовый - 1 г, спирт этиловый 96% - 100 мл, глицерин - 5 мл. Фильтровальную бумагу пропитывают красителем, высушивают и нарезают полосками по размеру покровного стекла. При окрашивании на фиксированный мазок помещают полоску фильтровальной бумаги, наносят несколько капель дистиллированной воды и выдерживают в течение 2 минут. После этого бумагу снимают, оставшуюся жидкость сливают, препарат промывают водой. Затем на препарат последовательно наносят раствор Люголя на 2 минуты, этиловый спирт на 20-30 секунд и снова промывают водой. В заключении на препарат на 1-2 минуты наносят раствор фуксина, избыток красителя смывают водой, препарат высушивают при комнатной температуре или фильтровальной бумагой.

Этапы окрашивания бактерий по Граму и результаты окрашивания представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Этапы окрашивания по Граму

Краситель	Продолжительность окрашивания	Результат окрашивания	
		грамположительные	грамотрицательные
Генциановый фиолетовый	1-2 минуты	синие	синие
Раствор Люголя	1-2 минуты	синие	синие

Этиловый спирт	30 секунд	синие	бесцветные
Фуксин	1-2 минуты	синие	красные

Впервые этот метод окрашивания микробов описал в 1884 г. датский бактериолог Г. К. Грам (рисунок 61).



Рисунок 61 – Ганс Кристиан Йоахим Грам (Hans Christian Joachim Gram, 1853-1938 гг.).

Окрашивание микробов по Граму зависит от строения и химического состава клеточной стенки бактерий (рисунок 62).

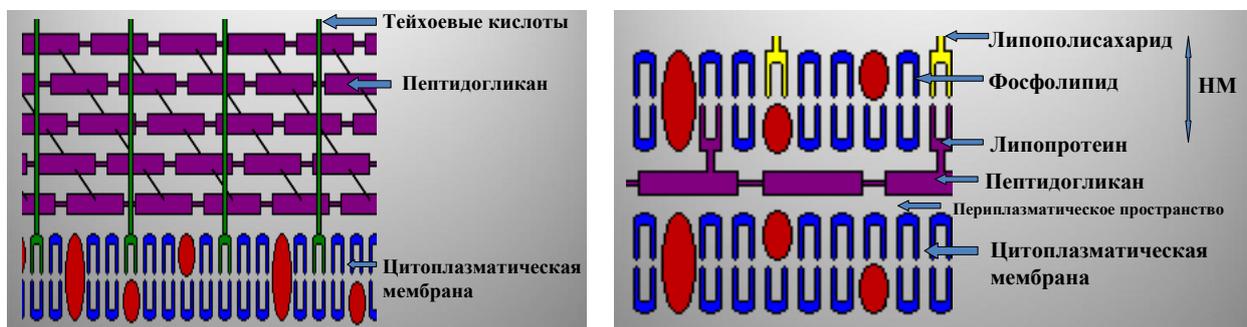


Рисунок 62 – Строение клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий (НМ – наружная мембрана).

В клеточной стенке грамположительных микробов содержится большое количество пептидогликана и тейхоевых кислот, с которыми генциановый фиолетовый в присутствии раствора Люголя образует комплекс. Этот комплекс не растворяется этиловым спиртом, поэтому клетка прочно удерживает генциановый фиолетовый. Кроме того, при обработке препарата этиловым спиртом сужаются поры в слое пептидогликана, что также препятствует выходу комплекса из клеточной стенки. Такие бактерии окрашиваются генциановым фиолетовым и в последующем не воспринимают фуксин, в результате чего клетки имеют фиолетовую окраску.

У грамотрицательных микробов не образуется прочного соединения генцианового фиолетового и йода с компонентами клеточной стенки. На

последующих этапах красители легко вымываются этиловым спиртом. Такие клетки дополнительно окрашиваются фуксином в красный (розовый) цвет.

Все бактерии при окраске по Граму распределяются следующим образом (таблица 2).

Таблица 2 – Распределение бактерий на группы при окрашивании по Граму

Морфологическая группа бактерий	Грамположительные	Грамотрицательные
Кокки	Все кокки, кроме нейссерий	Нейссерии (гонококки и менингококки)
Палочки	Спорообразующие палочки (бациллы и клостридии) Ветвящиеся и способные к ветвлению палочки (микобактерии, коринебактерии) Листерии	Все остальные палочки
Извитые бактерии	Нет	Все извитые бактерии (спириллы, спирохеты)

Промышленностью выпускаются приборы для автоматического окрашивания бактерий по Граму (рисунок 63).



Рисунок 63 – Прибор для автоматического окрашивания по Граму.

Кислотоустойчивые бактерии с трудом воспринимают красители в результате наличия в клеточной стенке специфических компонентов (липиды, воска). Основным методом окрашивания кислотоустойчивых бактерий является метод Циля-Нельсена. Этот метод предложили в 1883 г. для окрашивания микобактерий туберкулеза немецкий бактериолог Франц Циль (Franz Ziehl, 1857 – 1926 гг.) и немецкий патолог Ф. Нельсен (рисунок 64).



Рисунок 64 – Фридрих Карл Адольф Нельсен (Friedrich Carl Adolf Neelsen, 1854 – 1898 гг.).

### **Методика окрашивания бактерий по Цилю-Нельсену:**

1. На фиксированный мазок помещают полоску фильтровальной бумаги и наносят несколько капель карболового фуксина Циля. Можно использовать заранее заготовленную пропитанную фуксином и высушенную фильтровальную бумагу, на которую наносят 2-3 капли воды.

2. Мазок с краской 2-3 раза подогревают на пламени спиртовки до появления паров, каждый раз оставляя препарат в сторону для охлаждения.

3. Бумажку с краской снимают и остывший препарат промывают водой.

4. Препарат обесцвечивают 5% раствором серной кислотой.

5. Препарат тщательно промывают водой.

6. Докрашивают препарат раствором метиленовой синьки в течение 3-5 минут.

Кислотоустойчивые бактерии по методу Циля-Нельсена окрашиваются в рубиново-красный цвет, некислотоустойчивые бактерии - в синий цвет (рисунок 65).

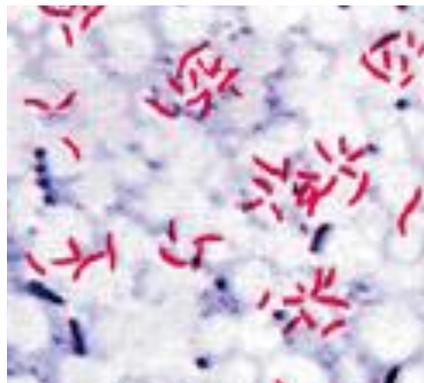


Рисунок 65 – Окрашивание микобактерий туберкулеза методом Циля-Нельсена.

Для окрашивания бактерий по Цилю-Нельсену выпускаются готовые наборы красителей (рисунок 66).



Рисунок 66 – Набор красителей для окрашивания бактерий по Цилю-Нельсену.

Для выявления **капсулы** у бактерий применяют метод окрашивания **по Бурри-Гинсу**. Для этого на предметное стекло наносят каплю туши, а рядом с ней - каплю исследуемого материала. Обе капли тщательно перемешивают и с помощью стекла со шлифованным ребром из полученной смеси готовят толстый мазок. Мазок высушивают, фиксируют на пламени спиртовки и окрашивают фуксином или сафранином в течение 2-3 минут. Краситель сливают, мазок высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой. Бактерии окрашиваются в красный цвет, капсулы остаются неокрашенными и четко выделяются на черном фоне (рисунок 67).

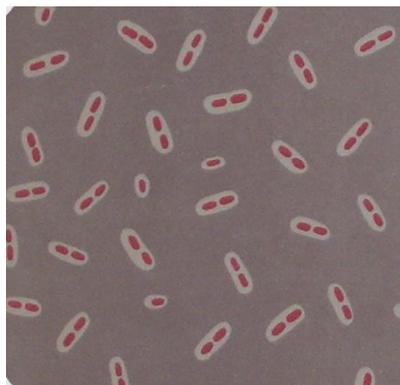


Рисунок 67 – Окрашивание капсулы методом Бурри-Гинса.

**Окрашивание спор** бактерий проводят методами Циля-Нельсена или Ожешки. При использовании этих методов вегетативные клетки окрашиваются в синий цвет, а споры – в красный цвет. При окрашивании спор **по методу Ожешки** на предметном стекле готовят густой мазок исследуемой культуры, высушивают его и, не фиксируя, наливают на него 0,5% раствор соляной кислоты. Препарат подогревают в течение 2 минут до появления паров. Кислоту сливают. После этого препарат промывают водой, высушивают и фиксируют. На препарат помещают полоску фильтровальной бумаги и наносят несколько капель карболового фуксина Циля. Препарат подогревают на пламени спиртовки до появления паров. Затем препарат обесцвечивают 5% серной кислотой и докрашивают дополнительно метиленовой синькой в течение 3-5 минут. Споры окрашиваются фуксином в ярко-красный цвет, а вегетативные клетки обесцвечиваются серной кислотой и окрашиваются метиленовой синькой в синий цвет (рисунок 68).

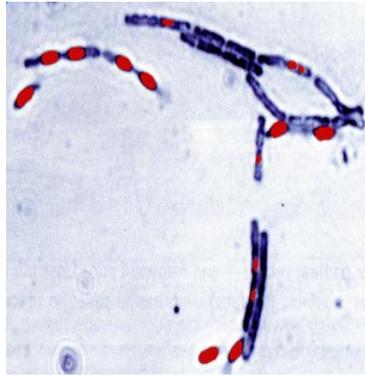


Рисунок 68 – Окраска спор *Bacillus cereus* методом Ожешки.

Таким образом, для выявления отдельных структур бактериальной клетки применяют сложные методы окрашивания, представленные в таблице 3.

Таблица 3 – Сложные методы окрашивания клеточных структур бактерий

Структура бактерий	Метод окрашивания	Вид препарата
Клеточная стенка	У некислотоустойчивых – метод Грама	Грамположительные бактерии – фиолетовые Грамотрицательные бактерии - розовые
	У кислотоустойчивых – метод Циля-Нельсена	Кислотоустойчивые бактерии – красные Некислотоустойчивые бактерии - синие
Споры	По Ожешко	Споры – красные Вегетативные клетки - синие
Капсула	По Бурри-Гинсу	Капсула бесцветная Микробная клетка - красная
Жгутики	По Морозову	Жгутики – светло-желтые Микробная клетка – темно-коричневая
Нуклеоид	По Романовскому-Гимзе	Нуклеоид – фиолетовый Цитоплазма – бледно-розовая
Зерна волютина	По Нейссеру	Зерна волютина – синие Микробная клетка – желтая

## Приложение 1

### Рецепты приготовления растворов красителей

**1. Фуксин основной, насыщенный спиртовый раствор:**

Фуксин основной	10 г
Этанол (96%)	100 мл

Фуксин основной вносят в этанол, перемешивают, смесь оставляют на сутки для насыщения раствора.

**2. Фуксин основной карболовый (фуксин Циля):**

Насыщенный спиртовый раствор основного фуксина	10 мл
Водный раствор фенола (5%)	100 мл

Растворы спешивают, через 48 часов смесь фильтруют. Краситель отличается устойчивостью.

На практике применяют также следующий рецепт приготовления карболового фуксина:

Фуксина (основного)	1 г
Карболовой кислоты кристаллической	5 г
Спирта 96°	10 мл
Глицерина	несколько капель
Воды дистиллированной	100 мл

Порошок фуксина тщательно растирают с карболовой кислотой в ступке, добавив несколько капель глицерина; во время растирания приливают понемногу спирт. Когда смесь превратится в полужидкую кашицу (без комков), приливают понемногу, продолжая все время размешивать, дистиллированную воду. Дают постоять 2 суток, после чего фильтруют.

**3. Фуксин основной, водно-спиртовый или водный (Пфейффера):**

Карболовый фуксин Циля	1 мл
Вода дистиллированная	9 мл

Разбавленный раствор фенола нестойк, поэтому его готовят перед применением.

**4. Метиленовый синий, насыщенный раствор:**

Метиленовый синий	3 г
Этанол (96%)	100 мл

Компоненты смешивают, оставляют на 2-3 суток при периодическом перемешивании, затем фильтруют. Раствор устойчив при хранении.

**5. Метиленовый синий, разбавленный раствор:**

Насыщенный раствор метиленового синего	1 мл
Вода дистиллированная	40 мл

**6. Уксуснокислая синька Нейссера:**

Метиленовый синий	0,1 г
Этанол (96%)	2 мл
Уксусная кислота	5 мл
Дистиллированная вода	100 мл

**7. Метиленовый синий по Лёффлеру:**

Насыщенный раствор метиленового синего	30 мл
Вода дистиллированная	100 мл
Гидроокись калия, 1% раствор	1 мл

После смешивания компонентов смесь выдерживают в течение суток и фильтруют, после чего краситель готов к употреблению. Раствор стойкий и хорошо хранится в течение длительного времени.

**8. Генциановый фиолетовый феноловый раствор:**

Раствор I.

Генциановый фиолетовый	1 г
Этанол (96%)	10 мл

Раствор 2.

Фенол	2,5 г
Вода дистиллированная	до 100 мл

После полного растворения генцианового фиолетового растворяют фенолы.

**9. Карболовый генцианвиолет** готовят также по следующему рецепту:

Генцианвиолет	1 г
Карболовая кислота кристаллическая	5 г
Спирт (96%)	10 мл
Глицерин	несколько капель
Вода дистиллированная	100 мл

Порошок генцианвиолета тщательно растирают с карболовой кислотой в ступке, добавив несколько капель глицерина; во время растирания приливают понемногу спирт. Когда смесь превратится в полужидкую кашицу (без комков), приливают понемногу, продолжая все время размешивать, дистиллированную воду. Дают постоять 2 суток, после чего фильтруют.

**10. Кристаллический фиолетовый (по Хукеру):**

Раствор I.

Кристаллический фиолетовый	2 г
Этанол (96%)	20 мл

Раствор 2.

Аммоний щавелевокислый	0,8 г
Вода дистиллированная	80 мл

Растворы смешивают и выдерживают перед использованием 2 суток.

**11. Раствор эритрозина:**

Эритрозин	3 г
Вода дистиллированная	200 мл
Фенол	5 г

После растворения эритрозина и фенола смеси дают отстояться сутки.

**12. Жидкую натуральную тушь** разводят водопроводной водой в десять раз (1 мл туши в 9 мл воды), разливают в пробирки по 3-5 мл, автоклавируют при 0,5

ати. После этого суспензии дают отстояться 2 недели и используют для окраски некоторых компонентов клетки, в частности – капсул.

**13. Сафранин.** 2 г краски растворяют в 100 мл смеси спирта этилового 96%-ного и дистиллированной воды поровну или в 100 мл кипящей дистиллированной воды. Фильтруют.

**14. Малахитовый зеленый** (водный раствор). 1 г краски растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Фильтруют.

**15. Конго красный:** 3 г краски растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

**16. Раствор Люголя.** 2 г калия йодида растворяют в 25 мл дистиллированной воды. Затем к раствору добавляют 1 г йода кристаллического, доводят до 300 мл дистиллированной водой, фильтруют.

**17. Раствор везувина:**

Везувин	2 г
Спирт (96%)	60 мл
Дистиллированная вода	40 мл
Смесь кипятят, после охлаждения – фильтруют.	

## Приложение 2

### Методы окрашивания микробов

**1. Метод Ольта.** Используется для выявления капсулы бактерий. Мазок окрашивают 2-3%-ным раствором сафранина. Краситель готовят перед употреблением, растворяя его в горячей воде с последующим фильтрованием. Окрашивают при легком нагревании в течение 1-3 минут и быстро промывают водой. Препарат не высушивают, на нем должна быть вода, накрывают покровным стеклом и рассматривают под иммерсионной системой микроскопа. Световые лучи, проходя через слой воды, усиливают разницу в преломлении лучей от капсулы и тела микробной клетки. В поле зрения микроскопа видно, что тела микробных клеток окрашены в красный цвет, капсулы - в желтый.

**2. Метод Михина.** Используется также для выявления капсулы бактерий. Фиксированный мазок окрашивают метиленовым голубым Лёффлера в течение 2-3 минут при подогревании. Краситель быстро смывают водой, мазок высушивают. При микроскопировании тела микробных клеток выглядят темно-синими, капсулы - светло-розовыми.

**3. Окрашивание зерен волютина по методу Нейссера.** Для этого фиксированный мазок окрашивают уксуснокислой синькой в течение 1 минуты. Затем краску сливают, препарат промывают водой и обрабатывают раствором Люголя в течение 20-30 секунд. Не промывая водой, мазок окрашивают везувином в

течение 10-15 секунд. Затем препарат промывают водой, высушивают и исследуют с иммерсионной системой. Тела бактерий окрашиваются в нежный светло-коричневый цвет, зерна волютинина - в темно-синий, почти черный цвет.

**4. Окрашивание спор по методу Златогорова.** Мазок фиксируют над пламенем горелки. Затем на поверхность мазка помещают полоску фильтровальной бумаги, окрашенной основным феноловым фуксином Циля. Бумагу смачивают 3-5 каплями воды. Препарат подогревают в течение 5-7 минут, обесцвечивают 3%-ным водным раствором серной кислоты в течение 5-10 секунд и промывают водой. Дополнительное окрашивание проводят метиленовым голубым в течение 2-3 минут, после чего мазок промывают водой и высушивают. Споры окрашиваются в красный цвет, а вегетативные клетки - в синий.

**5. Окрашивание спор по Пешкову.** После фиксации препарата над пламенем горелки мазок окрашивают метиленовым голубым Лёффлера в течение 15-20 секунд, подогревая над пламенем спиртовки. Препарат промывают водой. Дополнительное окрашивание проводят 0,5%-ным водным раствором нейтрального красного в течение 30 секунд. Затем препарат промывают водой и высушивают. При этом методе споры окрашиваются в голубой или синий цвет, а вегетативные формы – в розовый.

**6. Окрашивание жгутиков бактерий по методу Леффлера.** Взвесь бактерий вносят в каплю воды (не размазывая ее петлей), нанесенную на предметное стекло, и дают высохнуть. Для обеспечения сохранности жгутиков необходимо чрезвычайно осторожное обращение с мазком во время всех манипуляций. Обрабатывают 15-20 минут при комнатной температуре протравой следующего состава: 1 мл насыщенного спиртового раствора фуксина и смесь из 10 мл 25% водного раствора танина с 5 мл насыщенного водного раствора сернокислого железа (протраву готовят за несколько суток до употребления; перед употреблением ее отфильтровывают). Препарат тщательно промывают водой, высушивают на воздухе. Докрашивают фуксином Циля в течение 3-4 минут при легком подогревании (без образования паров). Затем препарат промывают водой, высушивают над пламенем горелки.

**7. Окрашивание микробов по Романовскому-Гимзе.** Краска Романовского-Гимза – это смесь азура, эозина и метиленовой синьки. Раствор этой краски сине-фиолетового цвета. Она окрашивает клеточную цитоплазму в голубой цвет, а ядра клеток, зернистость, слизь, капсулы бактерий - в красно-фиолетовый цвет. Окрашивание по Романовскому-Гимзе позволяет обнаружить различные структурные компоненты клеток. Непосредственно перед окрашиванием бактерий к 10 мл дистиллированной воды добавляют 10 капель краски Романовского-Гимзы и тотчас же наливают на фиксированный препарат (или погружают препарат в стаканчик с краской). Через 1 час краску сливают, препарат промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют.

**8. Окрашивание гликогена** проводится путем добавления к капле культуры такого же количества раствора Люголя. При соединении с раствором Люголя гликоген приобретает красно-бурую окраску.

**9. Окрашивание гранулезы** осуществляется следующим образом. К капле микробной культуры добавляют каплю раствора Люголя и накрывают покровным стеклом. Под иммерсионной системой микроскопа видны микробные клетки и окрашенные в синий цвет зерна гранулезы.

**10. Окрашивание жира.** Жир окрашивают спиртовым раствором Судана III (0,05 г Судана III в 100 мл 96%-ного этилового спирта). С этой целью к капле культуры добавляют краситель и тщательно перемешивают. Препарат высушивают и микроскопируют. Капли жира окрашиваются в красный цвет, а цитоплазма бактерий остается неокрашенной.

**11. Окрашивание зерен волютина.** Волютин в микробных клетках встречается в виде гранул, которые состоят из полифосфатов. Гранулы волютина в микробной клетке обнаруживаются при окрашивании препарата по Омелянскому. С этой целью приготовленный мазок фиксируют над пламенем горелки и окрашивают в течение 30 секунд карболовым фуксином Циля. После промывания мазок обесцвечивают 1%-ным раствором серной кислоты в течение 20-30 секунд. Затем мазок вновь промывают водой и дополнительно окрашивают слабым раствором метиленового голубого (1:40) в течение 15-20 секунд. Микроскопическая картина: гранулы волютина красные, цитоплазма синяя.

### Вопросы для контроля усвоения материала

1. Расскажите об устройстве механической части светового микроскопа.
2. Расскажите об устройстве оптической части светового микроскопа.
3. Расскажите об устройстве осветительной части светового микроскопа.
4. Расскажите о принципиальном устройстве электронного микроскопа.
5. Что представляет собой микроскопия в светлом поле зрения?
6. Что такое иммерсионная микроскопия?
7. Расскажите об использовании фазово-контрастной микроскопии.
8. Что такое темнопольная микроскопия?
9. Что такое люминесцентная микроскопия и в чем ее преимущества?
10. Расскажите о правилах приготовления препаратов для микроскопии микробов в живом состоянии.
11. Расскажите о правилах приготовления препаратов для микроскопии микробов в окрашенном состоянии.
12. Что представляют собой простые методы окрашивания микробов?
13. Что такое сложные методы окрашивания микробов, какие сложные методы окрашивания микробов Вы знаете?
14. Сущность окраски по Граму.

15. Какие методы окрашивания применяют для выявления капсул, спор и жгутиков бактерий?

### Тренировочные тесты

1. К механической части микроскопа относится:

- объектив
- окуляр
- + штатив
- зеркало
- конденсор

2. К оптической части микроскопа относятся:

- + объективы
- тубус
- + окуляр
- микровинт
- осветитель

3. К осветительной части светового микроскопа относятся:

- макровинт
- + конденсор
- + зеркало
- предметный столик
- револьвер

4. К простым методам окрашивания микробов относится окрашивание:

- по Граму
- по Цилю-Нельсену
- + метиленовым синим
- по Пешкову
- + фуксином

5. К сложным методам окрашивания микробов относятся окрашивание:

- + по Граму
- + по Цилю-Нельсену
- фуксином
- метиленовым синим
- + по Ожешко

6. Окрашивание грамотрицательных бактерий в красный цвет объясняется:

- образованием в клетке нерастворимого в спирте комплекса веществ
- химической реакцией между йодом и фуксином
- химической реакцией между раствором Люголя и генцианвиолетом
- химической реакцией между фуксином и генцианвиолетом

+ обесцвечиванием клеточной стенки спиртом

7. Окрашивание грамположительных бактерий в фиолетовый цвет объясняется:

- высоким содержанием в клеточной стенке липидов
- + высоким содержанием в клеточной стенке пептидогликана
- + наличием в клеточной стенке тейхоевых кислот
- высокой концентрацией в клетке углеводов
- наличием капсулы

8. Жгутики выявляют при окраске мазка:

- по Граму
- по Бурри-Гинсу
- по Ожешко
- + серебрением по Морозову
- по Цилю-Нельсену

9. Капсула у бактерий выявляется с помощью:

- + окраски по методу Бурри-Гинса
- + электронной микроскопии
- окраски по методу Грама
- окраски по методу Циля-Нильсена
- окраски по методу Лёффлера

10. Кислотоустойчивые бактерии окрашивают с помощью:

- метода Грама
- + метода Циля-Нильсена
- метода Ожешко
- метода Бури-Гинса
- раствора Люголя

Примечание: правильные ответы отмечены знаком +.

### Список литературы

1. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие для студентов медицинских вузов / Под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова – М.: Медицинское информационное агентство, 2003. – 236 с.: ил.
2. Воробьев А.А. Медицинская и санитарная микробиология: учеб. пособие для студ. высш. мед. учеб. заведений / А.А. Воробьев, Ю.С. Кривошеин, В.П. Ширококов. – 2-е изд., стер. – М.: Издательский центр “Академия”, 2006. – 464 с.
3. Воробьев А.А., Быков А.С., Пашков Е.П., Рыбаков А.М. Микробиология: Учебник. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 1998. – 336 с.: ил.

4. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учебник для мед. вузов / А.И. Коротяев, С.А. Бабичев. - СПб.: СпецЛит, 2008. – 4-е изд., испр и доп. - 767 с.: ил.
5. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов / Под ред. А.А. Воробьева. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: ООО “Медицинское информационное агентство”, 2006. – 704 с.; ил., табл.
6. Мотавкина Н.С., Артемкин В.Д. Атлас по микробиологии и вирусологии. М.: Медицина, 1976. – 307 с.: ил.
7. Пожарская В.О., Райкис Б.Н., Казиев А.Х. Общая микробиология с вирусологией и иммунологией (в графическом изображении). Учебное пособие. М.: “Триада X”, 2004. – 352 с.
8. Поздеев О.К. Медицинская микробиология / Под ред. В.И. Покровского. – 3-е изд., стереотип. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 768 с.: ил.
9. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга 1 / Колл. Авторы // Под редакцией Лабинской А.С., Волиной Е.Г. – М.: Издательство БИНОМ, 2008. – 1080 с.: ил.
10. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований: Учебное пособие / Под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной. – М.: ОАО “Издательство “Медицина”, 2005. – 600 с.: ил.
11. Информационные ресурсы по медицинской микробиологии и иммунологии (Интернет – сайты):
  - <http://www.microbiology.ru>
  - <http://ru.wikipedia.org>
  - <http://immunology.ru>
  - <http://www.rusmedserv.com>
  - <http://www.molbiol.ru>

Иллюстрированное учебное пособие

Литусов Николай Васильевич

Бактериоскопические методы исследования