

## Лабораторна робота № 3

**Тема: *Методи вивчення структури клітинної стінки бактерій.  
Складні методи забарвлення (метод Грама)***

**Мета роботи:** Ознайомитись з будовою клітинної стінки прокаріотичних мікроорганізмів, засвоїти методи складного забарвлення (метод Грама).

**Матеріали, реактиви, обладнання:** мікроскоп, мікробіологічна петля, фільтрувальний папір, імерсійна олія, барвники, папірці Синьова, дистильована вода, предметні скельця; культури *Staphilococcus aureus*, *E. coli*, суміш бульйонної культури *Staphilococcus aureus*, *E. coli*.

### Основні відомості

Складні методи забарвлення застосовують для вивчення особливостей структури клітинної стінки бактерій і диференціації мікробів.

**Клітинна стінка** у різних мікробів характеризується різною молекулярною будовою, різноманітністю хімічного складу і біологічних властивостей. Головним компонентом клітинної стінки більшості водоростей є целюлоза, у міцеліальних грибів – хітин, у дріжджів – глюкоза і манани, у бактерій – пептидоглікани.

**Целюлоза** – лінійний гомополісахарид, який складається із залишків D-глюкози, зв'язаних між собою (1-4) глікозидними зв'язками.

**Пептидоглікани** – складні дволанцюжкові гетерополімери, які складаються з N-ацетилглюкозоаміну і N-ацетилмурамової кислоти. Різноманітність пептидогліканів у прокаріот надзвичайно велика (понад 100 типів). Але у метанобактерій і галофілів (архебактерій) відсутні пептидоглікани, а в мікоплазм клітинна стінка взагалі відсутня.

Хімічний склад і структуру клітинної стінки визначають забарвленням бактерій за методом Грама. Забарвлення за Грамом є важливим методом для диференціації різних видів бактерій. Вперше він був розроблений і застосований датським вченим Х. Грамом у 1884 році для виявлення бактерій у гістологічних зрізах. Щодо забарвлення за методом Грама, всі бактерії діляться на дві групи: ті, що забарвлюються за Грамом – грампозитивні (фірмакутні), і які не забарвлюються за Грамом – грамнегативні (грацілакутні).

Сутність цього методу полягає в тому, що барвники трифеніл-метанового ряду (генціановий фіолетовий, кришталевий фіолетовий, метиловий фіолетовий) у комплексі з йодом утримуються грампозитивними клітинами при знебарвленні їх спиртом. Такі бактерії залишаються забарвленими в синє-фіолетовий колір. Грамнегативні бактерії знебарвлюються спиртом і їх виявляють, додатково забарвлюючи контрастним барвником (водяним фуксином). Механізм забарвлення за Грамом до кінця не виявлено, але в основі лежить особливість хімічного складу і будови клітинної стінки. Обробка препаратів спиртом призводить до набрякання пептидоглікану і зменшення діаметра пор клітинної стінки, що призводить до зменшення її проникності.

## Хід роботи

### **Завдання 1.** Виявлення клітинної стінки бактерій за методом Грама.

Для забарвлення за методом Грама студенти готують мазки двох видів бактерій, які забарвлюються і які не забарвлюються за Грамом. Готуються фіксовані препарати культур бактерій і забарвлюються за Грамом.

#### **Забарвлення за Грамом проводять так:**

а) на фіксований мазок кладуть шматочок фільтрувального паперу, попередньо просоченого спиртовим розчином генціанового фіолетового і наносять декілька крапель води так, щоб папірець став вологим і добре прилягав до скельця. Забарвлення проводять протягом 1-2 хвилин.

б) пінцетом знімається папірець, зливається барвник і, не промиваючи водою, наносять на препарат розчин Люголя на 1 хвилину (до почорніння препарату).

в) зливають розчин Люголя і обробляють мазок 96° етиловим спиртом протягом 30 секунд (препарат потрібно злегка погойдувати).

г) препарат промивається водою.

д) препарат дофарбовують водним фуксином протягом 1-2 хвилини.

е) зливаючи барвник, препарат промивають водою, висушують фільтрованим папірцем і мікроскопіюють.

Після такого забарвлення грампозитивні бактерії набувають темний синьо-фіолетового кольору, грамнегативні – отримують рожевий колір фуксину.

### **Завдання 2.** Вивчення препаратів грампозитивних і грамнегативних бактерій.

Підготовлені препарати студенти вивчають під мікроскопом. У полі зору: грампозитивні клітини – сині або фіолетові; грамнегативні – рожеві. Препарати замалювати, вказати повну видову назву бактерій, що вивчалися.