

Методика окрашивания и дифференцировки микроорганизмов с использованием красителя на растительной основе

Т.А. Ишунина, А.В. Шевченко, П.В. Калущкий, О.А. Медведева

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск

Контактная информация: к.м.н. Ишунина Татьяна Александровна, ishunina@gmail.com

Предложен новый метод идентификации микроорганизмов в простых и сложных схемах окраски, включая дифференцировку грамположительных, грамотрицательных и кислотоустойчивых бактерий с использованием красителя на основе спиртового экстракта плодов черноплодной рябины, обладающего основными свойствами. Красящий пигмент нового красителя – цианидин – имеет в своей структуре положительно заряженный оксониевый кислород, вступающий в донорно-акцепторную связь с атомом меди медного купороса. В результате этого взаимодействия происходит окрашивание базофильных структур клетки и микроорганизмов. Следует отметить выраженное сходство химической структуры цианидина и основных микробиологических красителей крезилового фиолетового и метиленового синего, что подтверждает возможность использования нового растительного красителя в микробиологических исследованиях.

Ключевые слова: дифференцировка микроорганизмов, грамположительные и грамотрицательные бактерии, цианидин, черноплодная рябина.

Введение

Для окраски микроорганизмов чаще всего используют основные красители – генциановый фиолетовый, кристаллический фиолетовый и метиленовый синий, имеющие сродство к кислым компонентам клетки. Благодаря этому основные красители хорошо окрашивают ядра клеток и микроорганизмы в простых (ориентировочных с использованием одного красителя) и сложных (дифференцирующих, с применением двух красителей) методиках окраски [2]. Из сложных методов наиболее популярен метод дифференцировки микроорганизмов по Граму, основанный на различиях толщины, плотности и химического состава их клеточной стенки. Грамположительные бактерии легко воспринимают

основные красители фиолетового цвета и прочно фиксируют их в своих стенках. Толщина клеточной стенки грамотрицательных бактерий не позволяет краске проникнуть внутрь, в результате чего она не фиксируется и легко смывается спиртом с поверхности бактерий, которые затем воспринимают дополнительный краситель другого цвета (чаще, фуксин контрастирующего красного цвета). Известны лишь единичные аналоги методики окраски по Граму. Среди них запатентованные способы с использованием насыщенного щелочного р-ра метиленового синего после фиксации ацетоном [9] и с применением метиленового синего и основного фуксина, растворённых в метиловом спирте [8]. В обоих случаях для грамположительных бактерий вме-

сто генцианового или кристаллического фиолетового применяют метиленовый синий. В настоящее время доступность и цена основных красителей преимущественно импортного происхождения несколько ограничивают их использование в повседневной микробиологической и гистологической практике.

В связи с этим, **целью** настоящего исследования стала разработка альтернативных методов окраски микроорганизмов на основе доступных, недорогих и нетоксичных ингредиентов. В качестве аналога генцианового/кристаллического фиолетового и метиленового синего был использован новый растительный краситель на основе спиртового экстракта плодов черноплодной рябины, который прекрасно зарекомендовал себя в гистологии для окраски ядер и др. базофильных компонентов клетки [7].

Материалы и методы

Для разработки нового способа окрашивания микроорганизмов использованы тест-штаммы *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) и *Mycobacterium smegmatis*, которые были получены из коллекции ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (Москва). Исследованные культуры микроорганизмов хранятся на кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России в столбиках полужидкого мясо-пептонного агара под вазелиновым маслом. Перед окраской и микроскопией микроорганизмы отсеивали на скошенный мясо-пептонный агар штриховым методом и инкубировали в термостате при 37°C в течение 24 ч.

Для приготовления красящего р-ра свежие или размороженные плоды черноплодной рябины разминают, сливают образовавшийся сок и заливают 90% этиловым спиртом в соотношении 1,25-1,3:1. Настаивание производится в защищённом от света месте, в тёмной посуде при комнатной температуре в течение 3-4 дней, затем настойку отжимают через 4-5-слойную марлю и получают густой тёмно-красный непрозрачный р-р, который помещают в посуду из тёмного стекла в холодильник (+4-6°C) для дальнейшего хранения. К 40 мл фильтрата добавляют 2-2,5 г медного купороса, размешивают, после чего он готов к использованию в течение 1 мес.

Результаты исследований

Простой метод окрашивания новым красителем

Бактериологические мазки фиксируют над пламенем спиртовки, наносят новый краситель на основе экстракта плодов черноплодной рябины на 4,5-5 мин, промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и изучают под микроскопом с объективом х90 и иммерсионным маслом. Грамположительные бактерии окрашиваются в различные оттенки синего цвета.

Сложные методы окрашивания новым красителем

Дифференцировка грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов

На фиксированные мазки музейных культур стафилококка (*S. aureus*), бацилл (*B. cereus*, *B. subtilis*) и кишечной палочки (*E. coli*) наносят новый краситель на основе спиртового экстракта плодов черноплодной рябины, содержащего медный купорос, на 4,5 мин, смы-

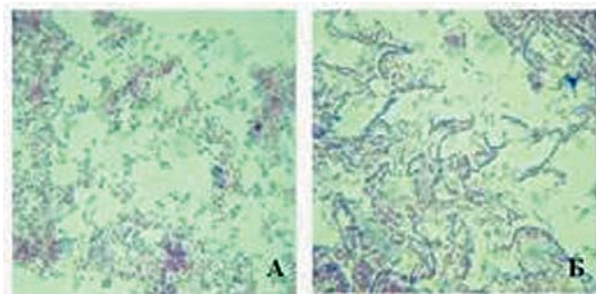


Рис. 1. Окраска смеси музейных культур стафилококка (*S. aureus*) и кишечной палочки (*E. coli*) (А) и смеси музейных культур *B. cereus* и *E. coli* (Б) новым способом с использованием красителя на основе спиртового экстракта плодов черноплодной рябины. Дифференцировка грамположительных бацилл и стафилококков (тёмно-синего или фиолетового цвета) и грамотрицательных кишечных палочек (окрашены в красный цвет) возможна в смешанных культурах с наличием нескольких типов микроорганизмов. Ув. $\times 10$ (окуляр), $\times 100$ (объектив).

вают 2 раза 96% спиртом, наносят 96% спирт на 20 с, промывают водой и наносят 1% эозин на 1 мин, затем промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой. Результат представлен на рис. 1.

B. cereus (рис. 2А) и стафилококки (рис. 2Б) и окрашиваются в тёмно-синий цвет, сенная палочка (рис. 2В) – в сине-фиолетовый, кишечные палочки – в красный (рис. 2Г). Для сравнения

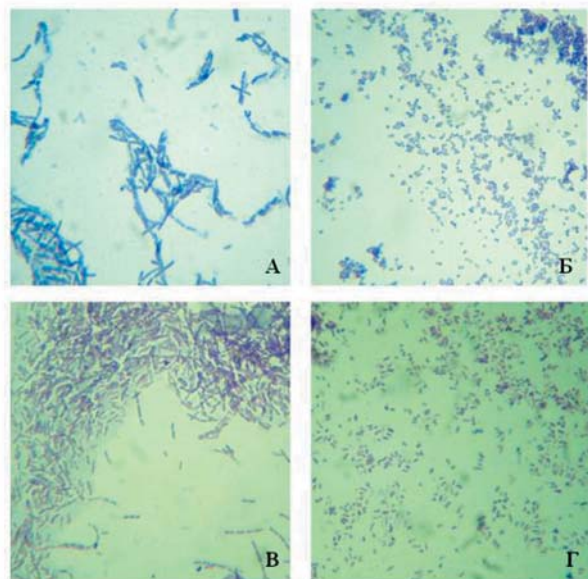


Рис. 2. Окраска бацилл (*B. cereus*) (А), стафилококков (*S. aureus*) (Б), сенных палочек (*B. subtilis*) (В) и кишечных палочек (*E. coli*) (Г) новым способом с использованием красителя на основе спиртового экстракта плодов черноплодной рябины. Грамположительные бациллы и стафилококки окрашиваются в синий или фиолетовый цвет, кишечные палочки – в красный. Ув. $\times 10$ (окуляр), $\times 100$ (объектив).

культуры стафилококка и кишечной палочки были окрашены классическим методом по Граму. Как оказалось, новый метод не уступает, а иногда и превосходит рутинный по чёткости идентификации микробов. От классического способа по Граму новый метод отличается не только заменой основного, но и кислого красителя. Вместо обычного кислого фуксина используется эозин, исключена экспозиция в р-ре Люголя, отмечено влияние кратности промывания в 96% спирте.

С помощью новой методики дифференцировка грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов возможна и в смешанных бактериологических мазках (рис. 1). Например, при одновременном окрашивании в одном мазке стафилококки (*S. aureus*) окрашиваются в тёмно-синий цвет, кишечные палочки (*E. coli*) – в красный (рис. 1А), бациллы (*B. cereus*) окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, кишечные палочки – в красный (рис. 1Б).

Дифференцировка кислотоустойчивых микробов

Новый растительный краситель может быть использован и в протоколе окраски бактериологических мазков по Циллю-Нильсену. После окраски карболовым фуксином и дифференцировке в кислоте кислотоустойчивые бактерии *Mycobacterium smegmatis* не воспринимали новый краситель и сохраняли красную окраску. Напротив, кишечные палочки и стафилококки после обесцвечивания в р-ре кислоты быстро окрашивались новым красителем в синий или фиолетовый цвет. Таким образом, новый краситель может быть использован на втором этапе окраски в протоколе по Циллю-Нильсену вместо метиленового синего.

Обсуждение результатов

Основные свойства нового красителя объясняются наличием в структуре его красящих пигментов (антоцианов) оксониевого кислорода, проявляющего катионные свойства в кислой среде [11]. Основные свойства антоциановых красителей, приготовленных на основе спиртовых экстрактов плодов черноплодной рябины, винограда, смородины и бузины, были наглядно продемонстрированы в гистологических исследованиях для окраски ядер клеток и др. базофильных структур [4-7]. При этом способность окрашивать базофильные структуры связана с преобладанием моногликозидных форм антоцианов [6]. Для микробиологических исследований наиболее подходит экстракт плодов черноплодной рябины. Это связано с наличием в них преимущественно моногликозидов цианидин 3-галактозида и цианидин 3-арабинозида [3, 13], большей стабильностью спиртового экстракта и тёмно-фиолетовым/синим цветом окрашиваемых структур, сходным с привычным оттенком метиленового синего и кристаллического/генцианового фиолетового, что особенно важно для дифференцировки микроорганизмов при одновременном окрашивании разными красителями. Для поддержания кислотности среды и стабильности антоциановых пигментов в качестве экстрагента используется спирт [1, 10, 12] и хранение в тёмном, защищённом от света месте при низких (+4-6°C) температурах в холодильнике [12]. Немаловажно, что структура основного пигмента плодов черноплодной рябины – цианидина – очень близка к химическому строению кристаллического/генцианового фиолетового и метиленового синего,

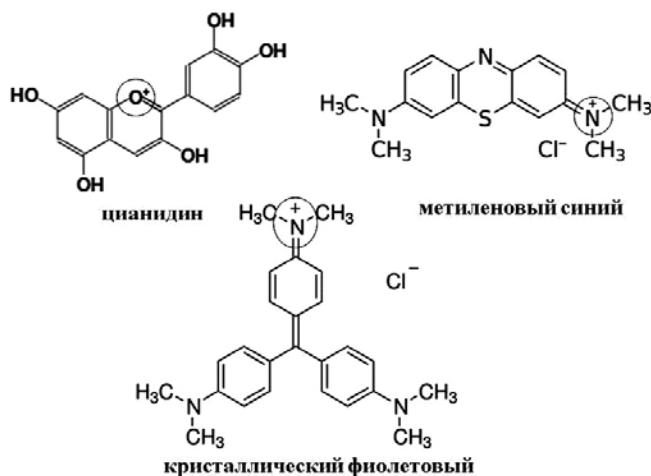


Рис. 3. Химическое строение основного красящего пигмента плодов черноплодной рябины (цианидина) и микробиологических красителей – кристаллического фиолетового и метиленового синего. Для всех приведенных красителей характерны сходная фенольная структура и наличие катионов (выделены кружочками), объясняющих их основные свойства.

содержащих похожие катионы (рис. 3). Сходство химического строения свидетельствует об аналогичном механизме окрашивания микроорганизмов новым растительным красителем и подтверждает возможность его использования с этой целью.

Закключение

Таким образом, в настоящей работе предложен новый метод окраски и дифференцировки микроорганизмов с помощью растительного красителя на основе антоцианов плодов черноплодной рябины, отличающегося более низкой себестоимостью, возможностью самостоятельного приготовления на основе свежих или замороженных ягод, использованием доступной соли – медного купороса, вступающей в донорно-акцепторную связь с оксониевым кислородом антоцианов черноплодной рябины. Впервые для идентификации микроорганизмов был использован растительный краситель.

Список литературы

1. Болотов В.М., Комарова Е.В., Филатова Е.С., Хрипушин В.В. Цветометрические характеристики композиционных каротиноидно-антоциановых экстрактов растительного сырья // Химия растительного сырья. – 2016. – № 1. – С. 127-134.
2. Борисов Л.Б., Козьмин-Соколов Б.Н., Фрейдлин И.С., Фёдорова З.Ф. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии (для мед. ин-тов) / Под ред. Л.Б. Борисова. – М.: Медицина. – 1979. – 286 с.
3. Дейнека Л.А., Шапошиников А.А., Дейнека В.И., Сорокопудов В.Н. Антоцианы: природные антиоксиданты и не только // Научные ведомости БелГУ. Сер. Медицина. Фармация. – 2006. – Т. 2. – № 4. – С. 92-100.
4. Ишунина Т.А. Гистологические красители на основе экстрактов ягод винограда и чёрной смородины // Морфологические ведомости. – 2015. – № 4. – С. 65-68.
5. Ишунина Т.А., Боева С.Г. Разработка технологии приготовления и применения гистологических красителей на основе экстрактов бузины чёрной, бархатцев распротёртых и донника лекарственного // Химия растительного сырья. – 2017. – № 2. – С. 163-169.
6. Ишунина Т.А., Моспанова А.А., Архипова А.Г. Применение экстрактов цветков ге-

- оргины, розы и пиона для гистологического окрашивания // Химия растительного сырья. – 2017. – № 3. – С. 221-226.
7. **Ишунина Т.А., Солоненко О.В.** Гистологический краситель на основе антоцианов ягод черноплодной рябины (*Aronia melanocarpa*) // Морфологические ведомости. – 2014. – № 4. – С. 58-61.
 8. **Кубеgekova Н.Г., Росляков А.А., Рыстаева Р.А., Белоусов В.Д.** Способ диагностики бактериальных микроорганизмов в патологическом материале из органов рыб, птиц, животных // Патент Республики Казахстан № 25877. – 2012.
 9. **Мавзютов А.Р., Туйгунов М.М., Габидуллин З.Г., Гашимова Д.Т., Булгаков А.К., Абдрахманов А.М., Хомякова Т.Р., Хасанова С.Г.** Способ дифференцирования грамположительных и грамотрицательных бактерий рода *Trichomonas* // Патент РФ № 2179580. – 2002.
 10. **Один А.П.** Преимущества использования этилового спирта как экстрагента для получения красных антоциановых красителей из растительного сырья // Известия вузов. Пищевая технология. – 2004. – № 4. – С. 46-48.
 11. **Писарев Д.И., Новиков О.О., Селютин О.А., Писарева Н.А.** Биологическая активность полифенолов растительного происхождения: перспектива использования антоцианов в медицинской практике // Научные ведомости БелГУ. Сер. Медицина. Фармация. – 2012. – Т. 10. – № 18/2. – С. 17-24.
 12. **Полина С.А., Хмарская Н.Е., Ефремов А.А.** Сравнительный анализ условий экстракционного извлечения антоцианов *Aronia melanocarpa* Сибирского региона // Журнал Сибирского Федерального Университета. Химия. – 2015. – Т. 8. – № 2. – С. 222-231.
 13. **Oszmianski J., Sapis J.** Anthocyanins in fruits of *Aronia melanocarpa* (chokeberry) // J. Food Sci. – 1988. – V. 53. – No. 4. – Pp. 1241-42.
 2. **Borisov L.B., Koz'min-Sokolov B.N., Frejdlin I.S., Fyodorova Z.F.** Rukovodstvo k laboratornym zanyatiyam po mikrobiologii (dlya med. in-tov) [Guide to laboratory studies in microbiology (for medical institutes)]. Ed. by L.B. Borisov. Moscow: Meditsina. 1979. 286 p. (In Russian).
 3. **Dejneka L.A., Shaposhnikov A.A., Dejneka V.I., Sorokopudov V.N.** Antotsiany: prirodnye antioksidanty i ne tol'ko [Anthocyanins: natural antioxidants and not only]. Nauchnye vedomosti BelGU. Ser. Meditsina. Farmatsiya [Scientific statements of Belgorod State University. Series Medicine, Pharmacy]. 2006. V. 2. No. 4. Pp. 92-100. (In Russian).
 4. **Ishunina T.A.** Gistologicheskie krasiteli na osnove ehkstraktov yagod vinograda i chyornoj smorodiny [Histological dyes based on extracts of grapes and black currant berries]. Morfologicheskie vedomosti [Morphological statements]. 2015. No. 4. Pp. 65-68. (In Russian).
 5. **Ishunina T.A., Boeva S.G.** Razrabotka tekhnologii prigotovleniya i primeneniya gistologicheskikh krasitelej na osnove ehkstraktov buziny chyornoj, barkhattsev rasprostyortykh i donnika lekarstvennogo [Development of technology for the preparation and use of histological dyes based on extracts of black elderberry, marigold spread and clover medicinal]. Khimiya rastitel'nogo syr'ya [Chemistry of plant materials]. 2017. No. 2. Pp. 163-169. (In Russian).
 6. **Ishunina T.A., Mospanova A.A., Arkhipova A.G.** Primenenie ehkstraktov tsvetkov georginy, rozy i piona dlya gistologicheskogo okrashivaniya [Use of dahlia, rose and peony flower extracts for histological staining]. Khimiya rastitel'nogo syr'ya [Chemistry of plant materials]. 2017. No. 3. Pp. 221-226. (In Russian).
 7. **Ishunina T.A., Solonenko O.V.** Gistologicheskij krasitel' na osnove antotsianov yagod chernoplodnoj ryabiny (*Aronia melanocarpa*) [Histological dye based on anthocyanin berries of Aronia rowan (*Aronia melanocarpa*)]. Morfologicheskie vedomosti [Morphological statements]. 2014. No. 4. Pp. 58-61. (In Russian).
 8. **Kubegekova N.G., Roslyakov A.A., Rystaeva R.A., Belousov V.D.** Sposob diagnostiki bakterial'nykh mikroorganizmov v patologicheskom materiale iz organov ryb, ptits, zhivotnykh [Method for the diagnosis of bacterial microorganisms in the pathological material from the organs of fish, birds, animals].

References

1. **Bolotov V.M., Komarova E.V., Filatova E.S., Khripushin V.V.** Tsvetometricheskie kharakteristiki kompozitsionnykh karotinoidno-antotsianovykh ehkstraktov rastitel'nogo syr'ya [Colorimetric characteristics of composite carotenoid-anthocyanin extracts of plant materials]. Khimiya rastitel'nogo syr'ya [Chemistry of plant materials]. 2016. No. 1. Pp. 127-134. (In Russian).

- Patent of Kazakhstan Republic № 25877. 2012. (In Russian).
9. *Mavzyutov A.R., Tujgunov M.M., Gabidullin Z.G., Gashimova D.T., Bulgakov A.K., Abdrakhmanov A.M., Khomyakova T.R., Khasanova S.G.* Sposob differentsirovaniya grampolozhitel'nykh i gramotritsatel'nykh bakterij roda *Trichomonas* [The method of differentiation of gram-positive and gram-negative bacteria of the genus *Trichomonas*]. Patent of RF № 2179580. 2002. (In Russian).
 10. *Odin A.P.* Preimushhestva ispol'zovaniya etilovogo spirta kak ehkstragenta dlya polucheniya krasnykh antotsianovykh krasitelej iz rastitel'nogo syr'ya [The advantages of using ethyl alcohol as an extractant for the production of red anthocyanin dyes from plant materials]. *Izvestiya vuzov. Pishhevaya tekhnologiya* [News of universities. Food technology]. 2004. No. 4. Pp. 46-48. (In Russian).
 11. *Pisarev D.I., Novikov O.O., Selyutin O.A., Pisareva N.A.* Biologicheskaya aktivnost' polifenolov rastitel'nogo proiskhozhdeniya: perspektiva ispol'zovaniya antotsianov v meditsinskoj praktike [Biological activity of plant polyphenols: the prospect of using anthocyanins in medical practice]. *Nauchnye vedomosti BelGU. Ser. Meditsina. Farmatsiya* [Scientific statements of Belgorod State University. Series Medicine, Pharmacy]. 2012. V. 10. No. 18/2. Pp. 17-24. (In Russian).
 12. *Polina S.A., Khmarskaya N.E., Efremov A.A.* Sravnitel'nyj analiz uslovij ehkstraktsionnogo izvlecheniya antotsianov *Aronia melanocarpa* Sibirskogo regiona // *Zhurnal Sibirskogo Federal'nogo Universiteta* [Comparative analysis of the extraction conditions of anthocyanin extraction of *Aronia melanocarpa* in the Siberian region]. *Khimiya* [Chemistry]. 2015. V. 8. No. 2. Pp. 222-231. (In Russian).
 13. *Oszmianski J., Sapis J.* Anthocyanins in fruits of *Aronia melanocarpa* (chokeberry). *J. Food Sci.* 1988. V. 53. No. 4. Pp. 1241-42.

The method of staining and differentiation of microorganisms using the plant-based dye

T.A. Ishunina, A.V. Shevchenko, P.V. Kalutskii, O.A. Medvedev

The new method of identification of microorganisms in simple and complex schemes of staining, including differentiation of gram-positive, gram-negative and acid-resistant bacteria using the dye with basic properties based on the ethanol extract of chokeberry, is proposed. The structure of the coloring pigment of the new dye – cyanidine – has the positively charged oxygen that forms donor-acceptor bonds with the copper atom of the copper sulphate. As a result of this interaction, basophilic structures of cells and microorganisms are stained. It should be noted that the chemical structure of cyanidine and of the main microbiological dyes cresil violet and methylene blue have pronounced similarity that confirms the possibility of using a new vegetable dye in microbiological studies.

Key words: differentiation of microorganisms, gram-positive and gram-negative bacteria, cyanidin, chokeberry.