

Тема 3

*Ультраструктура бактерий.
Кислотоустойчивые бактерии, их окраска по Цилю-Нильсену. Споры и их окраска по методу Ожешко. Внутриклеточные включения и их окраска по методу Нейссера*

Обсуждаемые вопросы:

- 1. Структура бактериальной клетки (особенности строения кислотоустойчивых бактерий)
- 2. Техника окраски кислотоустойчивых бактерий по методу Циля-Нильсена.
- 3. Значение метода Циля-Нильсена в диагностике туберкулеза.
- 4. Споры, условия и этапы образования спор.
- 5. Техника окраски спор по методу Ожешко
- 6. Волутиновые гранулы и выявление их методом Нейссера.

Цель занятия:

- ознакомить студентов с общей характеристикой, морфологией и ультраструктурой бактерий. Научить их методам приготовления мазков из гноя, крови, мокроты и чистой культуры, фиксации и окраски. Дать сведения об анилиновых красителях и простом методе окраски, подчеркнуть роль этого метода диагностики. Дать информацию о постоянных и непостоянных компонентах бактериальной клетки, о клеточной стенке грамотрицательных и грамположительных бактерий. Подчеркнуть роль окраски по Граму в диагностике инфекционных заболеваний. Объяснить студентам технику окраски гранул волютина по методу Нейссера

Кислотоустойчивые бактерии

Не обесцвечиваются кислотой, спиртом и щелочью из-за слабой проницаемости клеточной стенки. Это свойство обусловлено наличием в клеточной стенке:

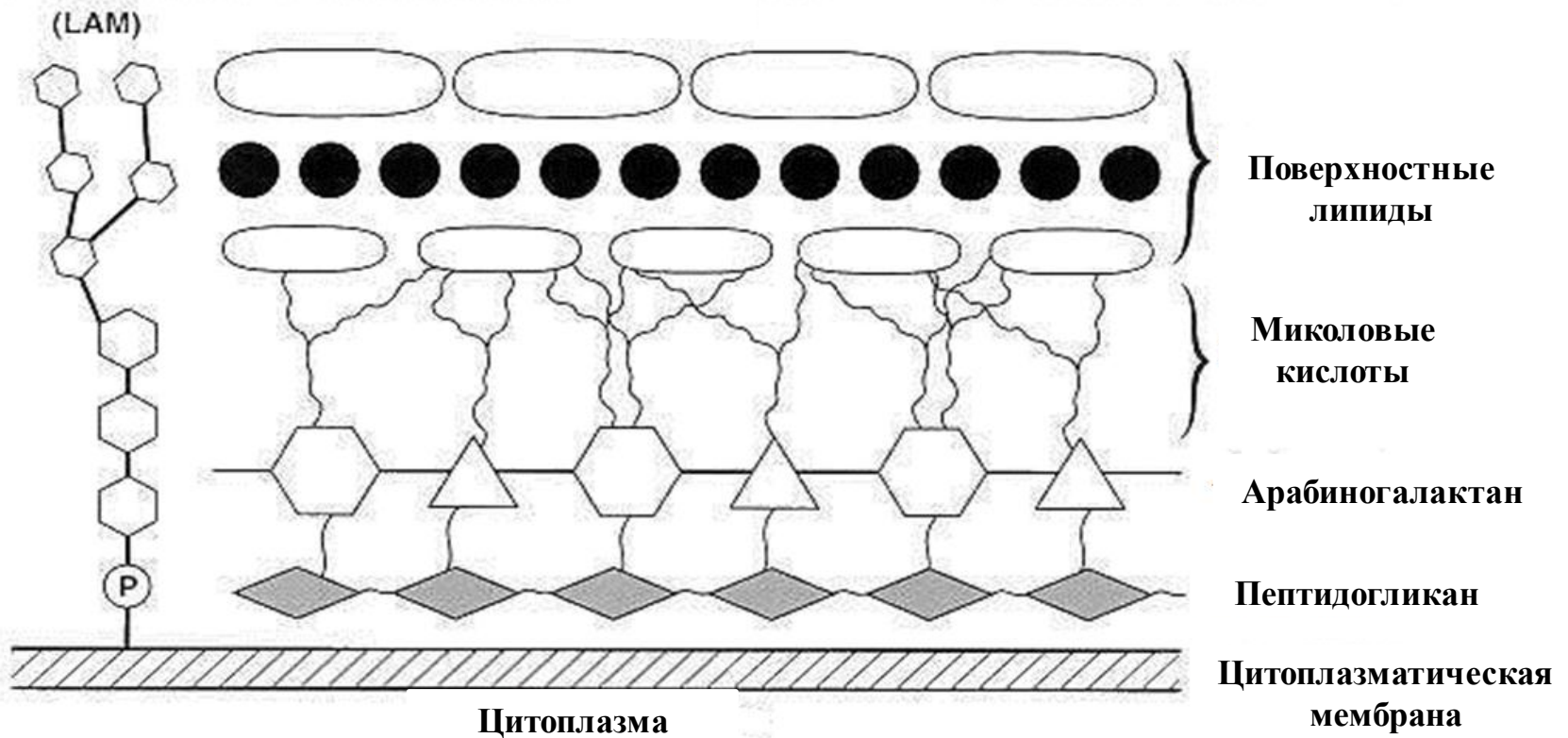
- *Липидов*
- *Миколовых кислот (восковидные субстанции и пр.)*
- *Оксикислот и пр.*

✓ *Mycobacterium tuberculosis* (возбудитель туберкулеза)

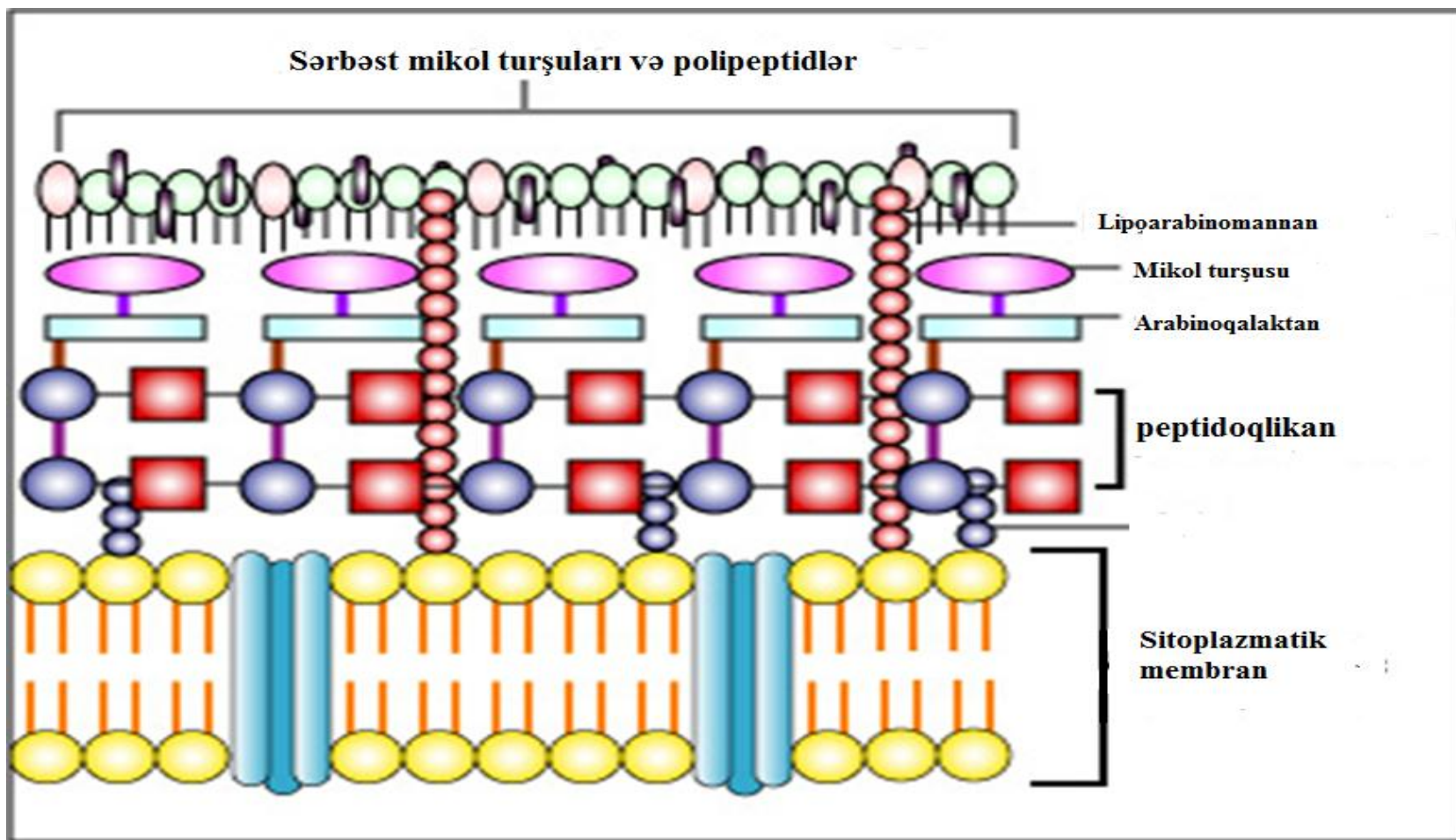
✓ *M. leprae* (возбудитель лепры)

✓ *некоторые представители рода Actinomyces*

Схема строения клеточной стенки кислотоустойчивых бактерий



Строение клеточной стенки кислотоустойчивых бактерий



Методика окраски по методу Циля-Нильсена

На высушенный и фиксированный мазок кладут фильтровальную бумагу, наливают карболовый фуксин, подогревают над пламенем горелки до появления паров, при подсыхании красителя добавляют повторно 2-3 раза карболовый фуксин на охлажденное стекло

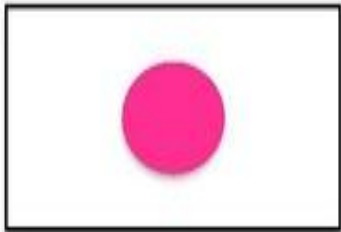
Снимают фильтровальную бумагу, охлаждают препарат и промывают водой. Обесцвечивают мазок погружением 3-5 раз в стаканчик с 5% раствором серной кислоты или 3% HCL

Мазок промывают водой и окрашивают метиленовым синим в течение 3-5 мин. Затем промывают еще раз, высушивают и микроскопируют. Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в красный цвет, так как не обесцвечиваются кислотой, некислотоустойчивые легко теряют окраску при обесцвечивании и окрашиваются в синий цвет

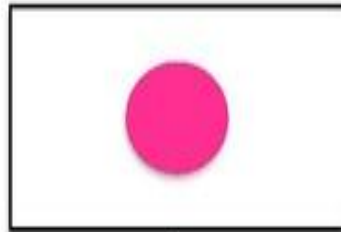
Этапы окраски по методу Циля-Нильсена

Реактивы	Кислото-устойчивые бактерии	Цвет	Некислото-устойчивые бактерии	Цвет
Карболовый фуксин		красный		красный
Кислота/спирт		красный		бесцветный
Метиленовый кислый		красный		синий

1. Apply primary stain of carbolfuscin for 30 seconds



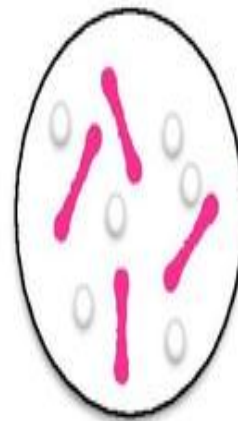
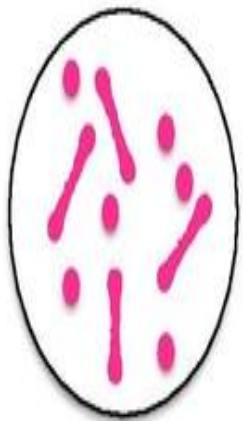
2. Heat fix cells to the slide using flame



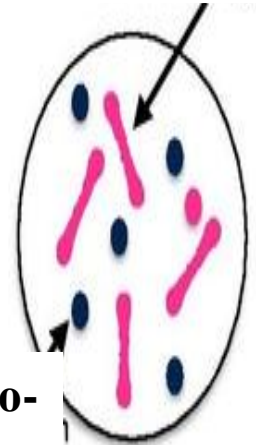
3. Decolorize with acid alcohol for 15-20 seconds



4. Apply counterstain of methylene blue for 30 seconds then rinse excess stain

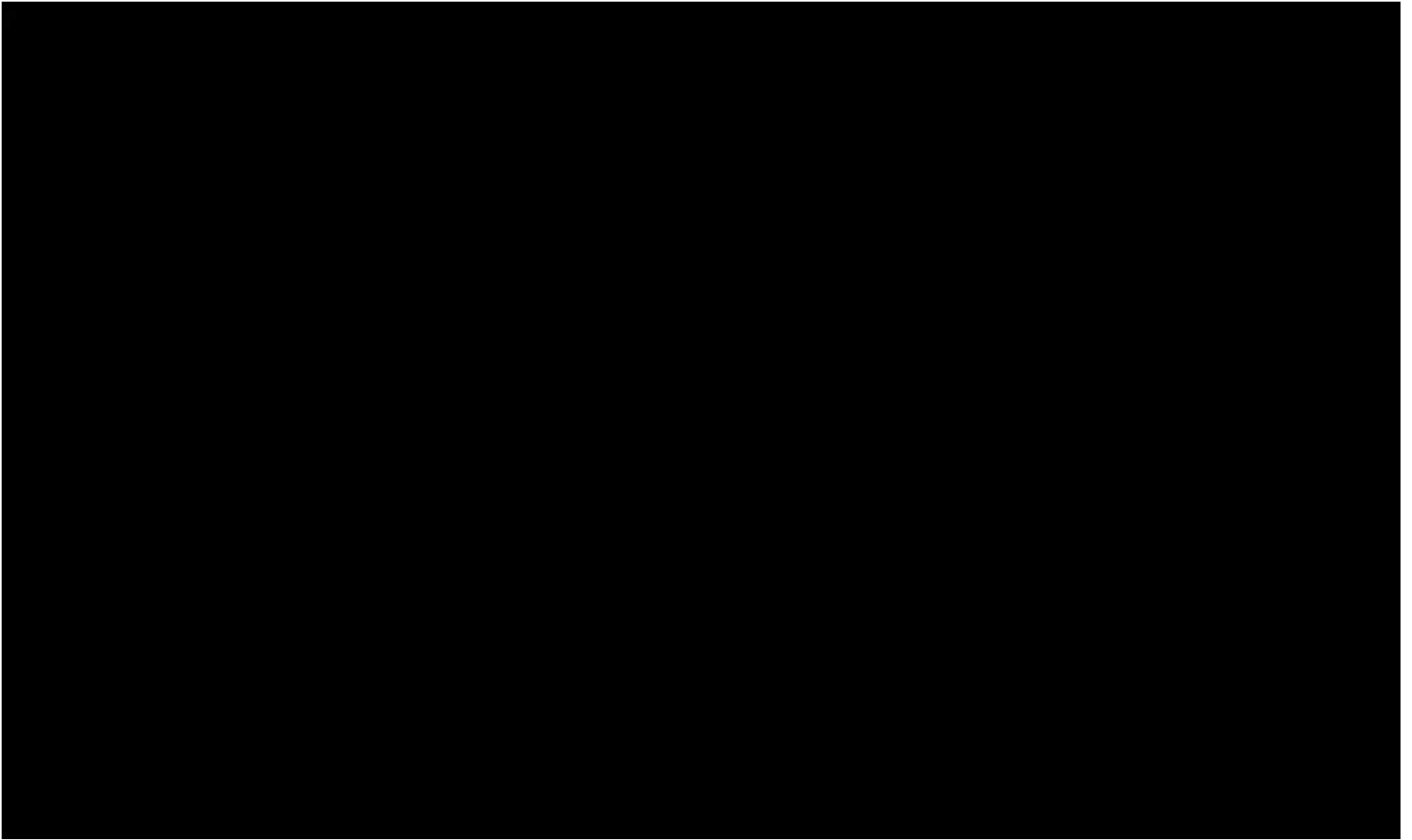


Кислотоустойчивые бактерии

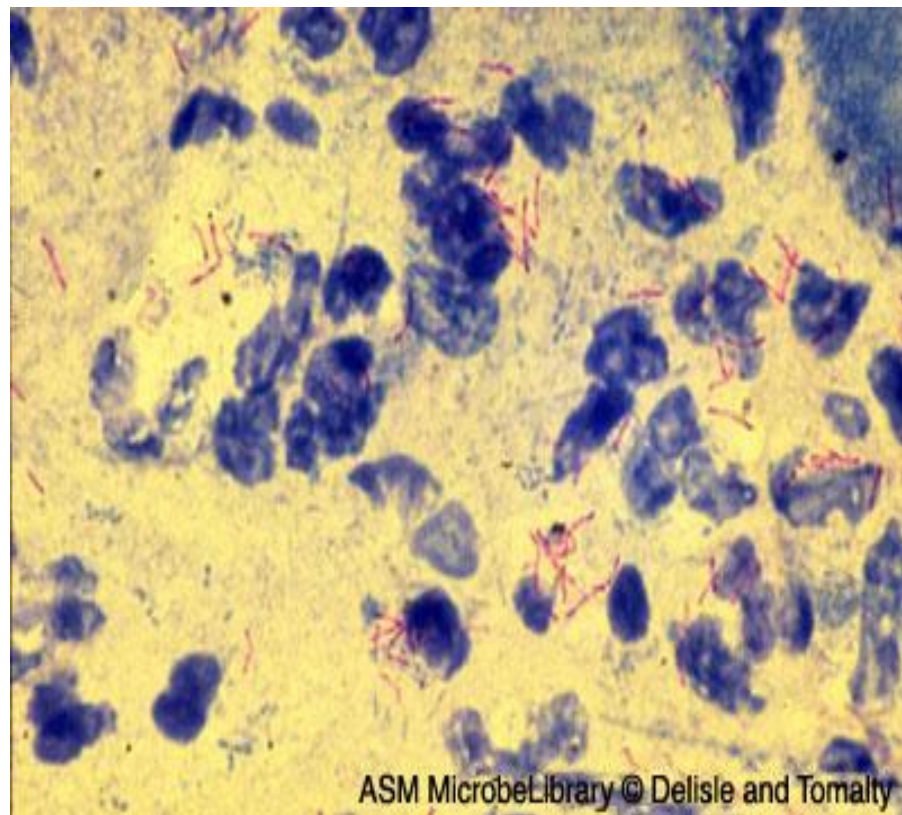
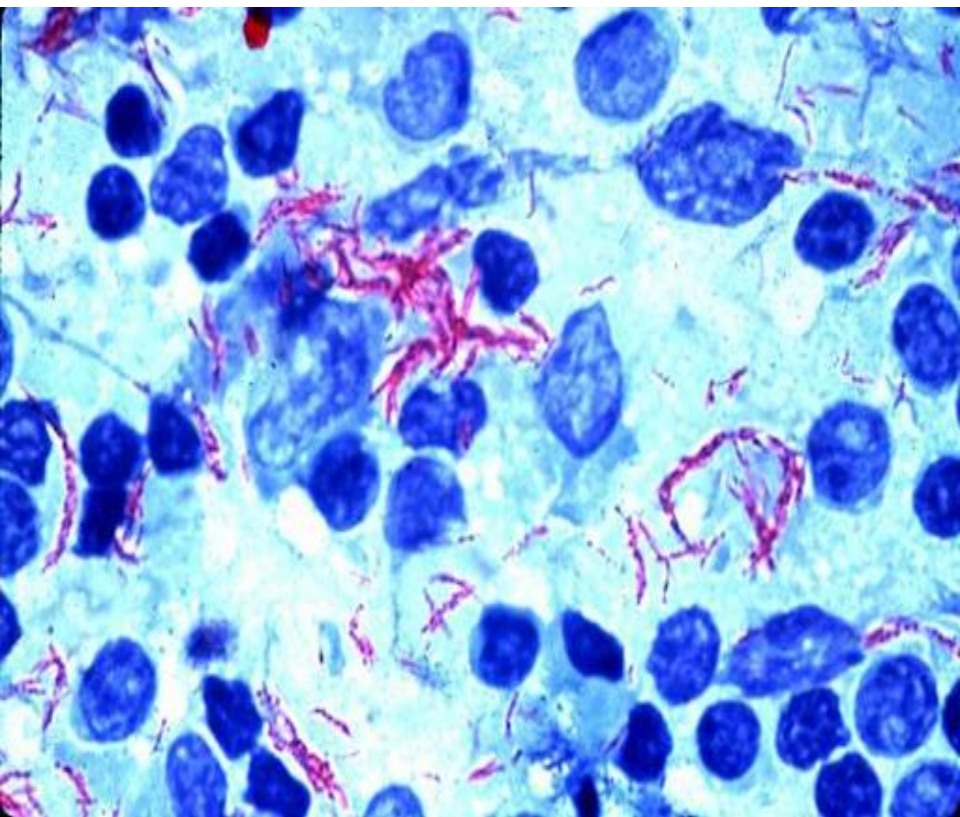


Некислотоустойчивые бактерии

Техника окрашивания по Цилю-Нильсену



Кислотоустойчивые бактерии



*Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в **красный** цвет*

*Некислотоустойчивые - в **синий** цвет*

Споры и спорообразование у бактерий

- **Определение:** *спора* – *покоящаяся форма бактерий, образующаяся при неблагоприятных условиях и способствующая сохранению генетической информации.*
- **Функция:** *защитная*
 - *от физико-химических факторов внешней среды*
 - *при дефиците питательных веществ*
- **Строение** – *ДНК, многослойная оболочка, в том числе пептидогликан (кортекс)*

Споры и спорообразование у бактерий

▪ *Образуются:*

- *Во внешней среде (вне организма человека)*
- *На искусственных питательных средах*

Факторы обеспечивающие устойчивость к температуре:

- *практическое отсутствие воды*
- *повышение концентрации кальция*
- *большое содержание диникотиновой кислоты*
- *строение пептидогликана кортекса*

Споры бактерий

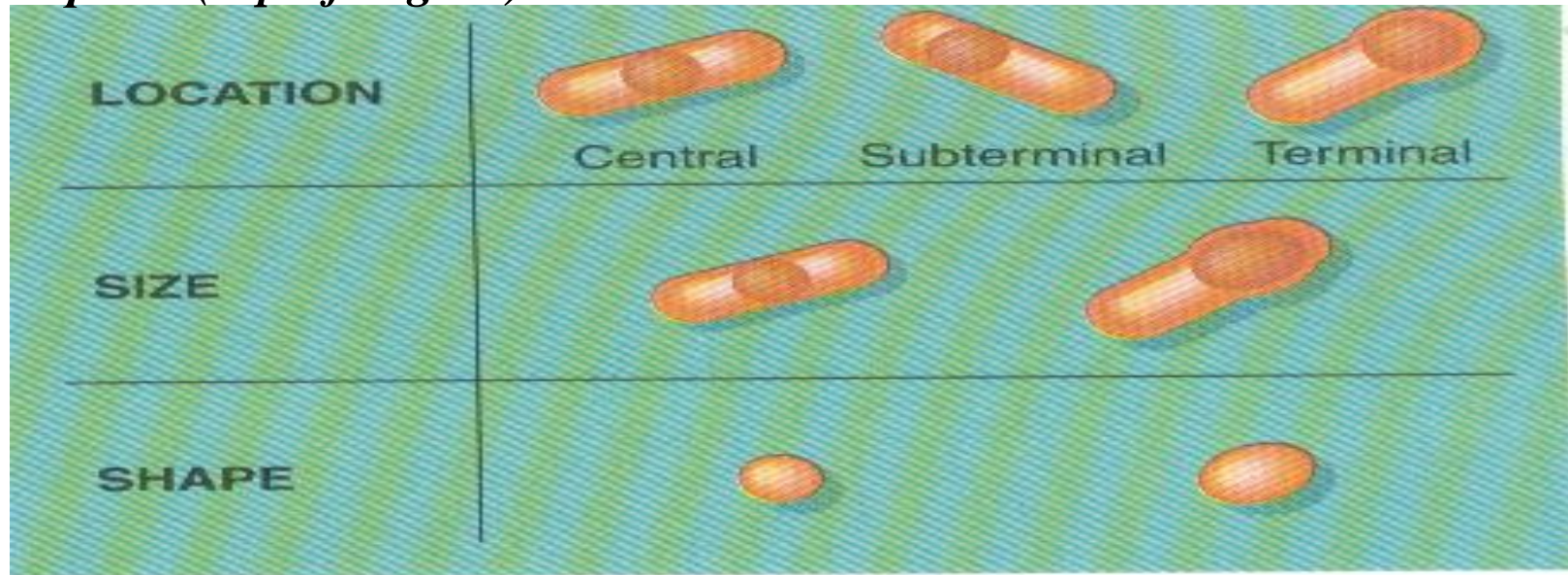
- *Форма сохранения вида в неблагоприятных условиях*
- *Процесс образования споры занимает 20-24 ч*
- *Слабая метаболическая активность*
- *Низкая проницаемость*
- *Устойчивы к кислотам, щелочам, спирту и температуре*
- *Образуется только грамположительными палочками (клостридиями и бациллами)*
- *Одна бактерия образует одну спору (споруляция)*
- *Из одной споры образуется одна бактерия (герминация)*
- *Споры могут долго сохраняться в окружающей среде*
- *В организме человека образуется только вегетативная форма, которая способна вызывать заболевание*

Расположение спор у бактерий

Центральное – у возбудителя сибирской язвы (*B.antracis*)

Терминальное – у возбудителя столбняка (*C.tetani*)

Субтерминальное – у возбудителя ботулизма (*C.botulinum*) и газовой гангрены (*C.perfringens*)



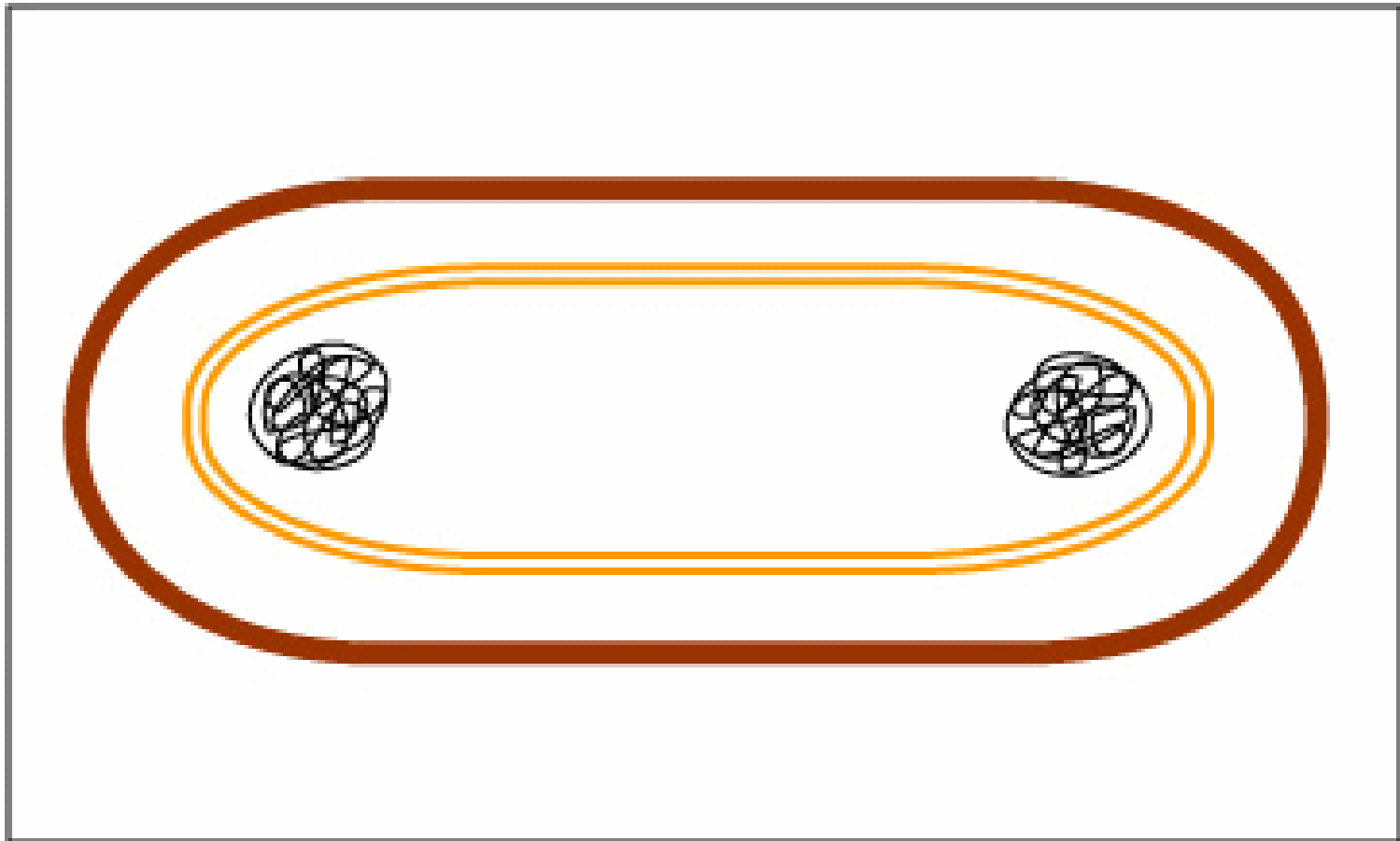
(a)



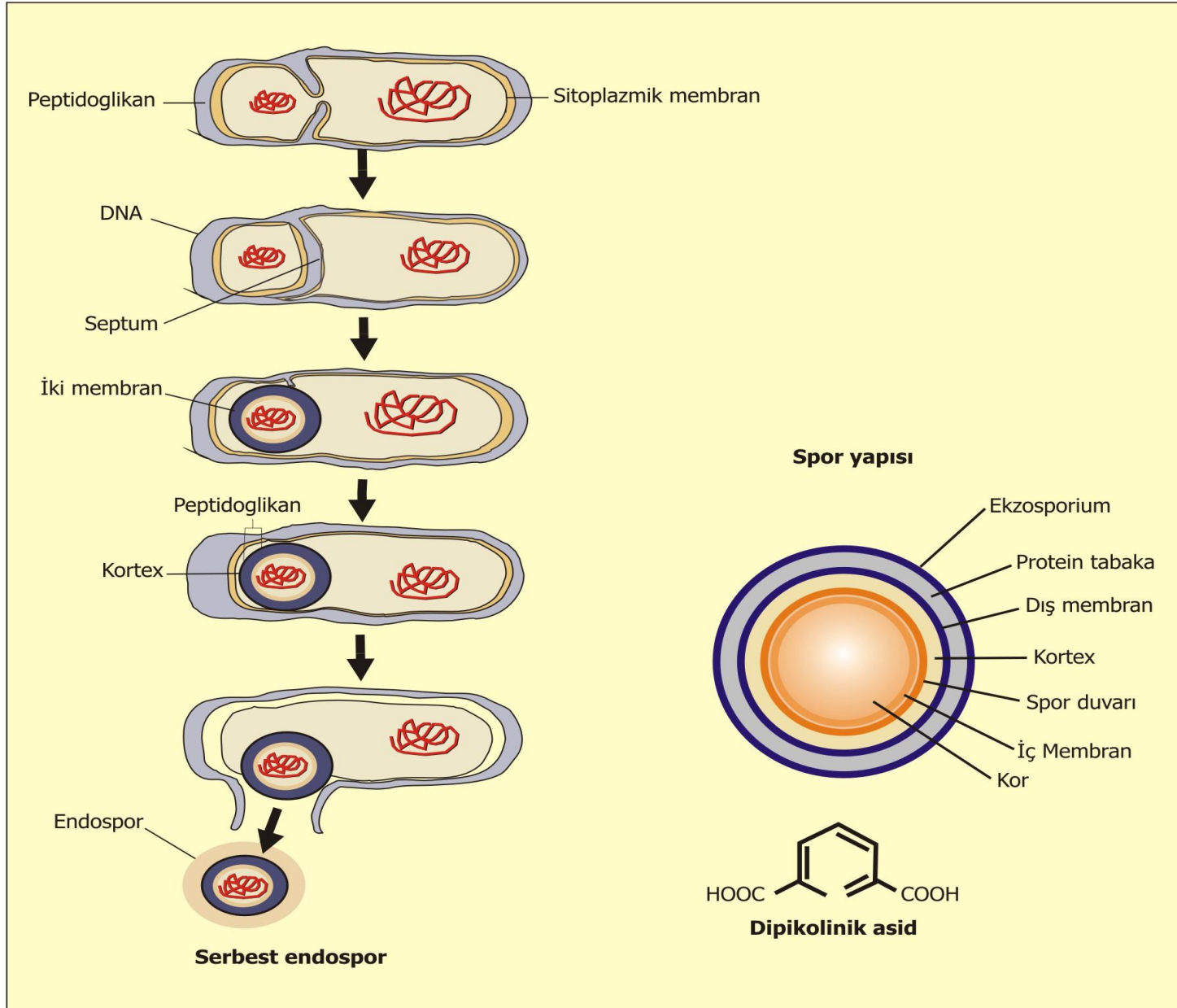
Споруляция

- Происходит при неблагоприятных условиях (н-р, в почве)
- Продолжается примерно 20-24 ч
- Уплотнение участка клетки с протоплазмой и нуклеоидом, и образование **проспоры**
- Повышается активность ферментов
- Уникальный фермент- **дипиколинсинтетаза (5-10%)**
- Проспора содержит **кальциевую соль дипиколиновой кислоты**
- **Проспора** окружена оболочкой, содержащей пептидогликан
- Располагающийся между оболочками слой пептидогликана называется **кортекс**
- **Внешний слой** споры содержит кератиноподобные белки
- Самый поверхностный слой споры **экзоспориум** содержит липопротеины и небольшое количество углеводов

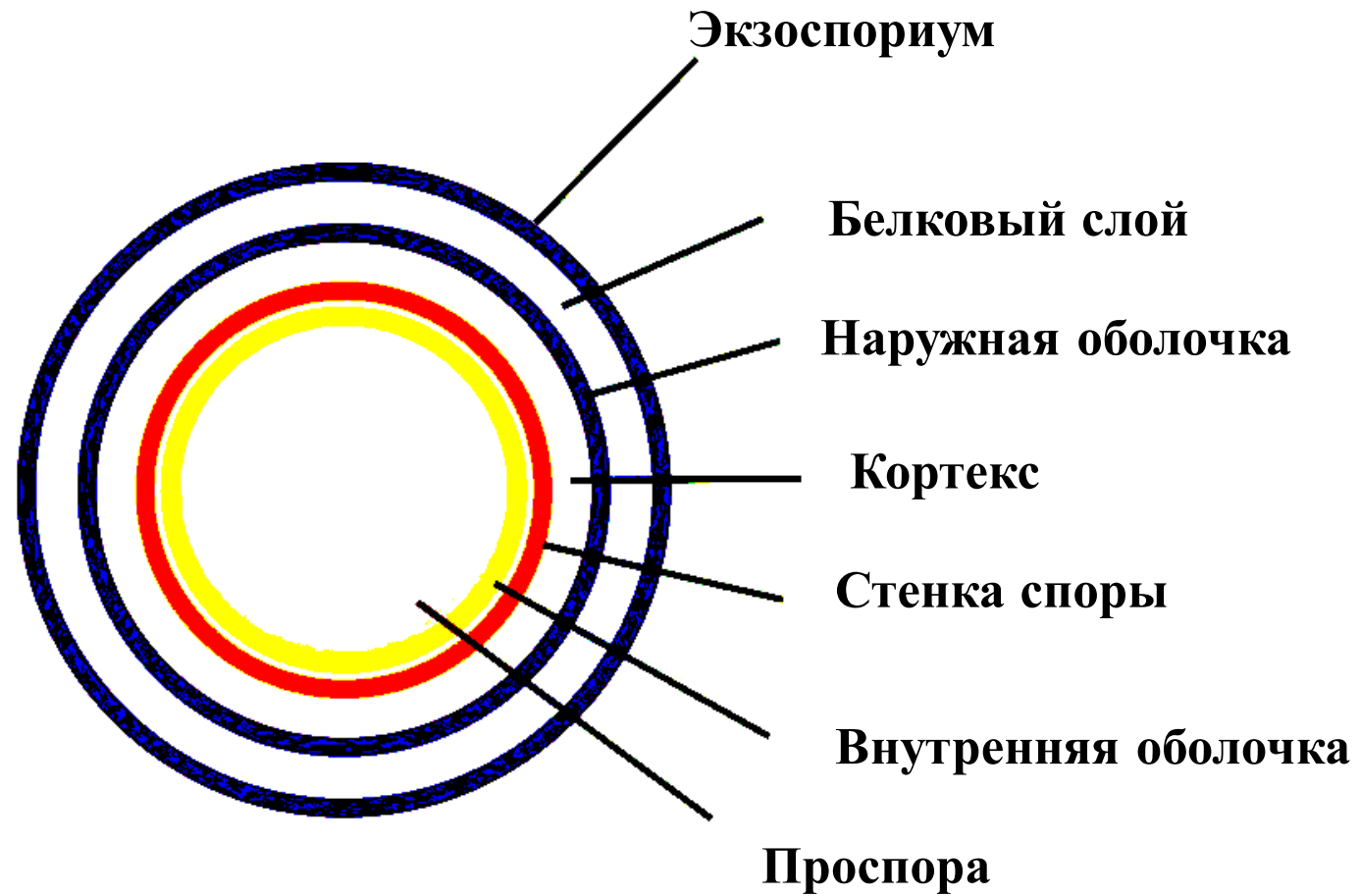
Процесс образования споры



Споруляция у бактерий



Ультраструктура споры

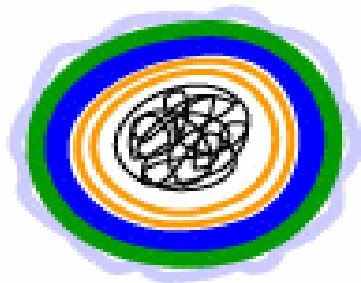


Спора бактерий под электронным микроскопом



Процесс герминации

В благоприятных условиях (организме человека) споры превращаются в вегетативные клетки. Данный процесс называется герминацией, и занимает 3-5 часов. В первую очередь кортекс разрушается под действием лизоцима, происходит выход вегетативной клетки. Затем происходят процессы роста и деления клетки.



Методика окраски споры по методу Ожешко

На высушенный, не фиксированный мазок наливают 0,5% р-р HCL и подогревают над пламенем горелки до появления паров (2-3мин).

*Остатки кислоты сливают, мазок после охлаждения **промывают водой**, высушивают, **фиксируют** в пламени горелки*

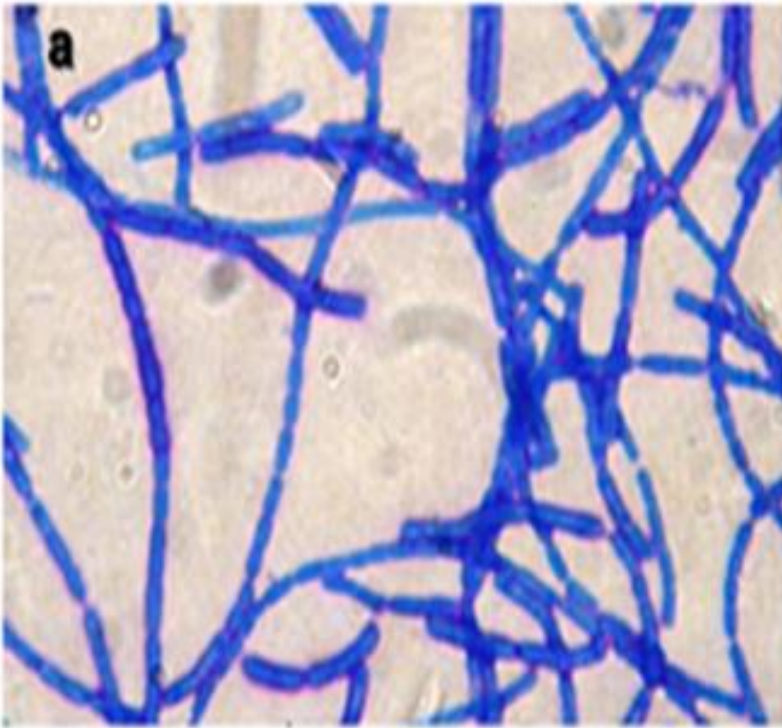
Далее препарат окрашивается по методу Циля-Нильсена.

*Споры окрашиваются в **красный** цвет, вегетативные клетки - в **синий**.*

Карболовая кислота смягчает оболочку споры и повышает ее тинкториальные свойства, и обе формы окрашиваются в красный цвет. Вегетативные формы обесцвечиваются серной кислотой, и окрашиваются метиленовым синим.

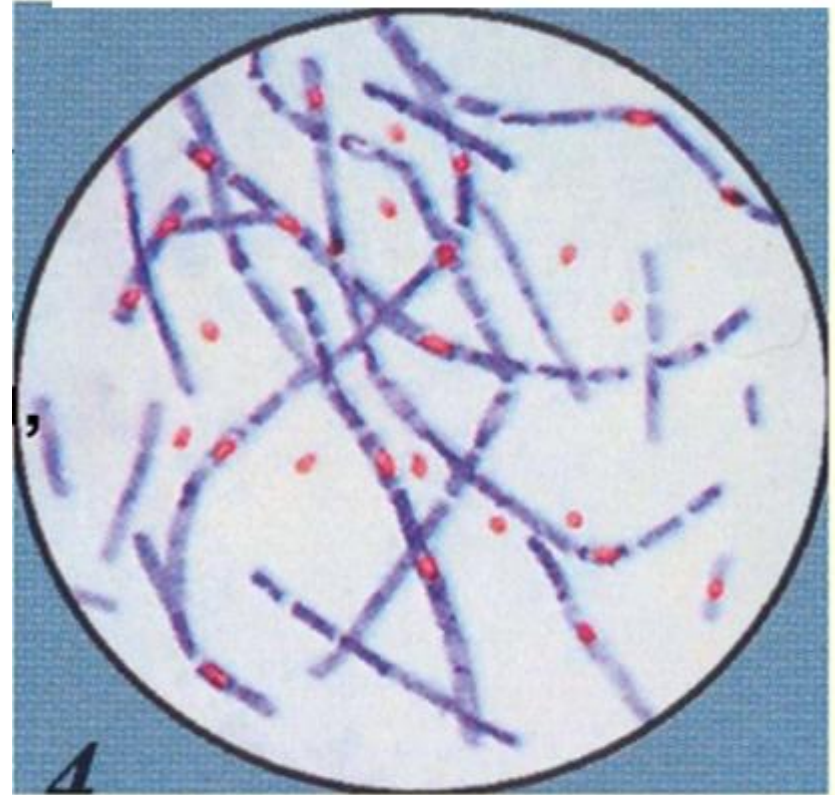
Bacillus anthracis

Вегетативная клетка



*Окраска вегетативной клетки
метиленовым синим*

спора



Окраска споры по методу Ожешко

Споры Bacillus anthracis

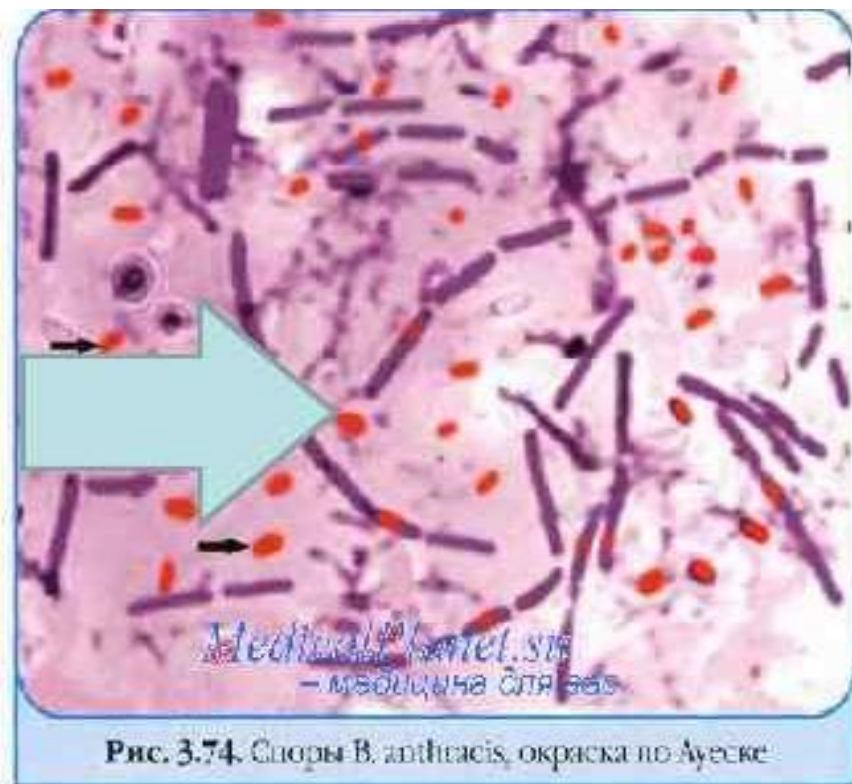
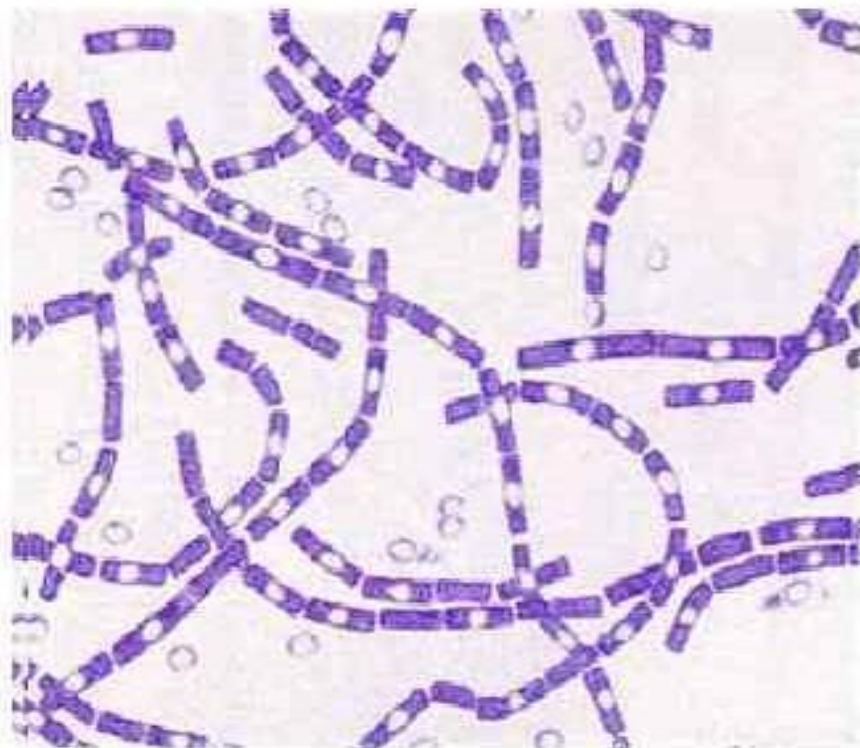
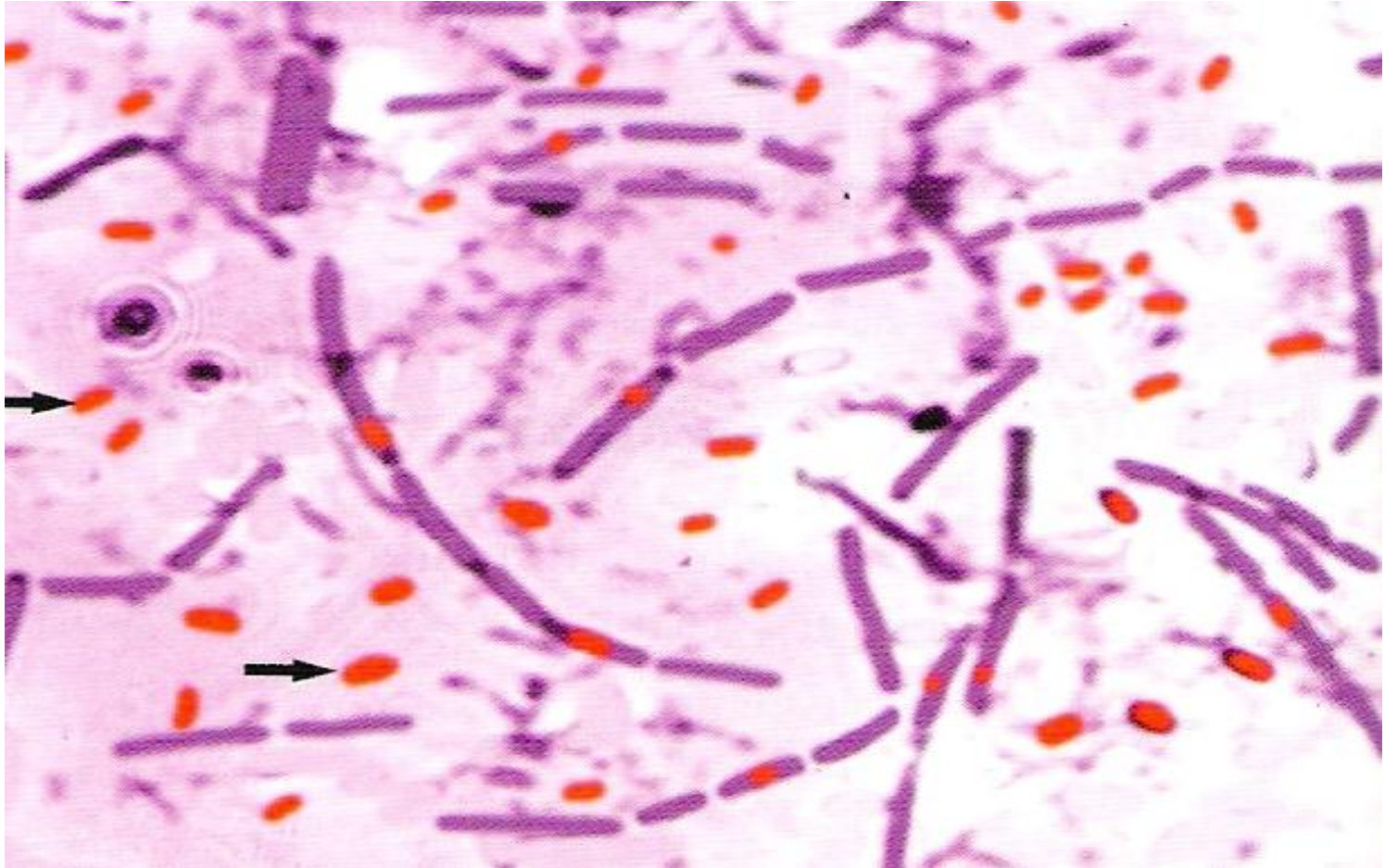


Рис. 3.74. Споры *B. anthracis*, окраска по Лoeffлеру

Микроскопическое изображение мазка, окрашенного по методу Ожешко



Зерна волютина

- *Внутрицитоплазматические включения в виде гранул полифосфатов. Впервые были описаны у **Spirillum volutans**.*
- *Накапливаются в клетке при избытке питательных веществ, за счет них клетка может несколько раз делиться в случае недостатка источника фосфора в среде.*
- *Некоторые микроорганизмы способны накапливать волютин в случае отсутствия питательных компонентов. Дрожжевые грибы, коринебактерии и микобактерии откладывают их на последней стадии роста.*

Зерна волютина

➤ Гранулы полифосфатов – метахроматические включения (зерна **Бабеша-Эрнста**) выявлены у коринебактерий (*Corynebacterium diphtheria*, *Gardnerella vaginalis* и пр.), играют роль при дифференциации этих бактерий.

➤ Обнаруживаются по **методу Нейссера**.

➤ При электронной микроскопии имеют вид электронно-плотных гранул размером 0,1-1,0 мкм

Corynebacterium diphtheria



Окраска по методу Нейссера

Техника окраски по методу Нейссера

*Фиксированный препарат окрашивают ацетатом синьки Нейссера в течение **2-3 мин.***

*Краситель смывают водой и наносят раствор Люголя на **30 сек - 1 мин.***

*Смывают раствор Люголя и докрашивают везувином или хризоидином в течение **5-7 мин.** Далее мазок промывают водой, высушивают и микроскопируют.*

Результат окраски по методу Нейссера



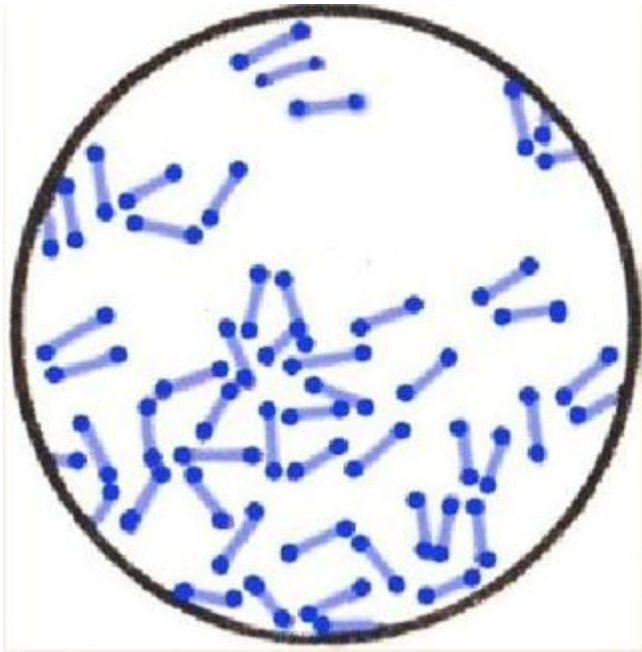
А.Л.Нейссер
(1855-1916)



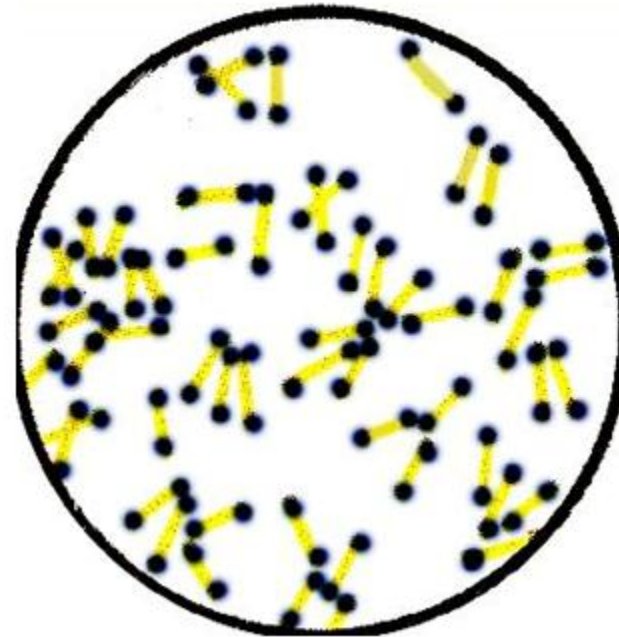
Зерна **волютина**, имеющие щелочную реакцию окрашиваются ацетатом синьки в темно-синий цвет.

Цитоплазма имеющая кислое значение рН воспринимает щелочной **везувин** и окрашивается **в желтый цвет**.

Зерна волютина у коринебактерий

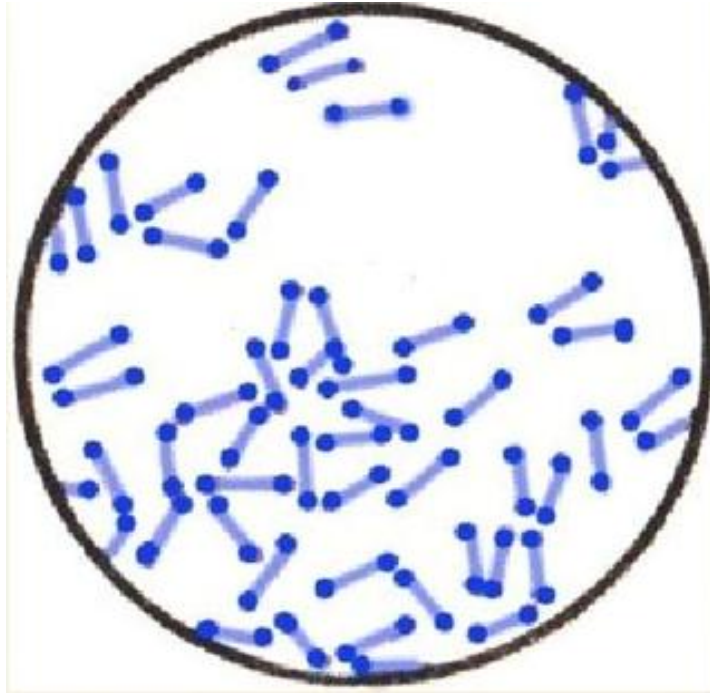


*Окраска по методу
Лёффлера*



*Окраска по методу
Нейссера*

Зерна волютина



Метод Лэффлера