**Занятие 3**

**Ультраструктура бактерий. Кислотоустойчивые бактерии, их окраска по методу Циля-Нильсена. Споры и их окраска методом Ожешко. Внутриклеточные включения и их окраска методом 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

**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

**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)

Образуются:

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

Факторы обеспечивающие устойчивость к температуре:

* практическое отсутствие воды
* повышение концентрации кальция
* большое содержание дипиколиновой 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 сохранятся 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)

**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 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.

**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

* Гранулы полифосфатов –метахроматические включения (зерна Бабеша-Эрнста) выявлены у коринебактерий (Corynebacterium diphteria, Gardnerella vaginalis и пр.), играют роль при дифференциации этих бактерий.
* Обнаруживаются по методу Нейссера.
* При электронной микроскопии имеют вид электронно-плотных гранул размером 0,1-1,0мкм

**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

* 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.