

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ТИНКТОРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ

Учебное пособие



Владивосток
Медицина ДВ
2015



Издательство «Медицина ДВ»
690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 4
Тел.: (423) 245-56-49. E-mail: medicinaDV@mail.ru

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Тихоокеанский государственный медицинский университет

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ТИНКТОРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ

Учебное пособие

Рекомендовано Учебно-методическим объединением по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России в качестве учебного пособия для обучающихся по основным профессиональным образовательным программам высшего образования – программам специалитета области образования Здравоохранение и Медицинские науки



Владивосток
Медицина ДВ
2015

УДК 579(075.8)
ББК 28.4я7
М806

*Издано по рекомендации редакционно-издательского совета
Тихоокеанского государственного медицинского университета*

Рецензенты:

Г.И. Чубенко – д.м.н., профессор,
заведующая кафедрой микробиологии, вирусологии
ГБОУ ВПО «Амурская государственная медицинская академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Т.Д. Примак – д.м.н., профессор,
заведующая кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии
ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Авторы:

Е.А. Зайцева, В.А. Шаркова, Р.Н. Диго,
Н.М. Воропаева, Ю.Н. Бронников

М806 Морфологические и тинкториальные свойства бактерий : учебное пособие. – Е.А. Зайцева, В.А. Шаркова, Р.Н. Диго и др. – Владивосток, 2015. – 80 с.

Учебное пособие подготовлено согласно программе дисциплины Микробиология в строгом соответствии с требованиями необходимых компетенций, предусмотренных ФГОС ВПО.

В пособии представлены материалы о современных микроскопах, красителях, используемых для окрашивания бактериальных препаратов, простых и сложных методах окраски микроорганизмов. Изложены сведения о микроскопии бактерий в живом состоянии, сущность и методики окраски для выявления морфологических особенностей микроорганизмов (формы клеток, размеры, подвижность, способность к образованию спор и капсул, а также наличие в клетках некоторых включений). Материалы учебного пособия достаточны для формирования основ рационального врачебного мышления и умения эффективно решать профессиональные задачи в будущем.

Пособие предназначено для студентов, обучающихся по дисциплине «Микробиология», по специальностям высшего образования: Медико-профилактическое дело, Лечебное дело, Педиатрия, Медицинская биохимия, Фармация, Стоматология.

УДК 579(075.8)
ББК 28.4я7

© Коллектив авторов ТГМУ, 2015
© «Медицина ДВ», 2015

Введение

Микробиологические исследования занимают важное место в общем комплексе клинико-лабораторных исследований, применяемых для профилактики, диагностики и лечения инфекционных заболеваний. Микроскопический метод является важной составляющей в общем комплексе лабораторной диагностики. Современная клиническая медицина предъявляет к микроскопическим исследованиям повышенные требования по увеличению объема, улучшению их качества.

Из-за недостаточной изученности многих микробов современные классификации практически не отражают их филогенетическое родство, а только позволяют ориентироваться в огромном числе и разнообразии форм. Одними из основных факторов классификации микроорганизмов считаются их морфологическая характеристика и тинкториальные свойства. Настоящее пособие посвящено методам их изучения.

Морфология и строение микробных клеток, величина которых измеряется в большинстве случаев микронами ($1 \text{ мк} = 0,001 \text{ мм} = 10^{-3} \text{ мм}$), изучается с помощью специальных приборов – микроскопов, обеспечивающих увеличение исследуемых объектов в сотни (световые микроскопы) и десятки тысяч (электронный микроскоп) раз. Первая глава учебного пособия посвящена описанию наиболее распространенных моделей современных микроскопов и различных методов микроскопии.

Для наблюдения микроорганизмов под микроскопом необходимо соответствующим образом приготовить препарат и красители (главы 2-3). В 4-й главе рассматриваются методы нативной микроскопии. Для выявления некоторых морфологических особенностей (форма клеток, их сочетание и размеры, подвижность, способность к образованию спор и капсул, а также наличие в клетках некоторых включений), количественного учета микробов, проверки чистоты культуры и ряда других целей готовят фиксированные окрашенные препараты, которые могут храниться длительное время. В главе 5 описаны простые и сложные методы окраски препаратов.

В приложение включены фотографии ученых, которые внесли огромный вклад в развитие микробиологии, разработав различные методы окраски микроорганизмов, с описанием их достижений в медицинской науке.

Для самостоятельного выполнения заданий предложены тестовый контроль и ситуационные задачи с эталонами ответов.

Глава I. Основные виды микроскопов

В микробиологии с помощью микроскопа изучают живые и убитые клетки микроорганизмов как в окрашенном, так и в неокрашенном виде.

Световой микроскоп (МБИ – 1, 2, 3, 6, 11). Все объекты рассматриваются в проходящем свете сухим и иммерсионным объективом. Разрешающая способность – 0,4-0,2 мкм. Увеличение при данной длине тубуса равно произведению увеличений объектива и окуляра. Минимальное – 630 (для иммерсионного объектива) и максимальное – 1350. Применяется для изучения морфологии, структуры, подвижности и тинкториальных свойств микроорганизмов.



Люминесцентный микроскоп. Использование ультрафиолетовых лучей и люминесцирующих красителей, способных светиться (флюоресцировать) под УФ-лучами. Позволяет наблюдать микроорганизмы в излучаемом ими свете и цвете. Разрешающая способность – 0,1 мкм. Повышение ее связано с работой коротковолновыми ультрафиолетовыми лучами. Максимальное увеличение – в 3000 раз. Преимущество – цветное изображение, высокая контрастность, возможность исследовать живые объекты. Применяется не только для изучения морфологии, и тинкториальных свойств, но и для исследования процессов жизнедеятельности микробной клетки.



Инвертированные микроскопы (темнопольный, фазово-контрастный). Исследования проводят в проходящем свете в светлом или темном поле с применением метода фазового контраста. МБИ – 12,13 снабжены собственными столиками-термостатами, кинокамерами. Линзы окуляра и объектива дают обратное увеличенное изображение. Позволяет проводить широкий круг микроскопических исследований: визуальное наблюдение, фотографирование, применение светлого и темного полей в прямом и отраженном свете, прямое и косое освещение, микроскопирование в поляризованном свете, методом фазовых контрастов, в свете люминесценции. Методы наблюдения в темном поле, фазово-контрастный используются с целью исследования живых клеток микроорганизмов.



Электронный микроскоп. Принцип действия и устройства подобен таковым у обычного светового микроскопа. Различия – вместо источника света – источник электронов (вольфрамовая проволока, нагреваемая электроток, вместо оптических линз – электромагнитные). Разрешающая – способность 0,001 мкм. Первое промежуточное увеличение в 130 раз, от проекционной линзы – в 20-200 раз, в целом – 2500-25000, максимум – в 100000 раз. Широко используется для изучения вирусов, мельчайших микроорганизмов. В бактериологии применяется для изучения деталей тонкого строения.



Стереомикроскоп. Дает подсвет в прямом и косопроходящем свете. Наиболее пригоден для крупных объектов (грибов). Изучение колоний, микологических культур.



1. Дополнительные устройства к микроскопу.

Бинокулярная насадка АУ-12. Приближает микроскопию к условиям естественного зрения. Повышение трудоспособности работающего с микроскопом. Разрешающая способность несколько увеличена. Применима к любому микроскопу.

Микрометр: объект, окуляр. Объект-микрометр и окуляр-микрометр позволяют определить размеры бактерий с помощью расчетных сеток. Разрешающая способность несколько повышается, дает возможность изучать микроорганизмы в нативном состоянии. Для определения размеров.

Темнопольный конденсор к световому микроскопу. Затемнение центральной части конденсора и, как следствие, боковое освещение объекта позволяет на темном фоне препарата видеть микроорганизмы в отраженном от них свете. Разрешающая способность повышается. То же, что и при темнопольной микроскопии.

Фазово-контрастное устройство (объектив). При обычной микроскопии в проходящем свете повышает контрастность и отражение за счет превращения фазовых смещений световой волны в амплитудные, улавливаемые глазом. В отличие от темнопольного устройства – дает возможность наблюдать контрастные живые неокрашенные объ-

екты на световом фоне. Используется для наблюдения за живыми биобъектами.

Столик-термостат. Сохраняет подвижность и жизнеспособность объекта. Применяется для изучения простейших.

2. Микроскопия препарата с иммерсионным объективом.

При использовании иммерсионных объективов между фронтальной линзой объектива и объектом исследования должна находиться жидкость.

Иммерсионный объектив дает увеличение $\times 90$ при условии отсутствия рассеивания потока лучей в связи с неоднородностью среды при их прохождении. Поэтому, во избежание такого дефекта используется иммерсионное кедровое масло или его заменитель – вазелиновое масло. Процесс микроскопии с иммерсионным объективом $\times 90$ ведут с окулярами $\times 7$, $\times 10$, но чаще с первым из них.

Место для микроскопа выбирается подальше от прямого солнечного света. Работа на столе с темной поверхностью способствует меньшему утомлению глаз. Рекомендуются смотреть в окуляр левым глазом, не закрывая правого. Удобнее работать с бинокулярным микроскопом.

Переносить микроскоп необходимо двумя руками: одной держать штатив, другой – основание микроскопа. Следует предохранять микроскоп от толчков, соприкосновения с сильнодействующими веществами типа кислот, щелочей.

Техника микроскопии состоит из нескольких этапов:

1. На готовый окрашенный мазок наносят каплю масла.
2. Под контролем глаза сбоку осторожно опускают тубус, погружая объектив в каплю масла. При неосторожном выполнении можно раздавить либо линзу объектива, либо предметное стекло.
3. После соприкосновения объектива с маслом дальнейшее опускание тубуса происходит с помощью микровинта микроскопа до появления микрообъектов в окуляре.
4. Просмотр препарата ведут только за счет манипуляций с микровинтом и движения стекла.
5. После окончания микроскопии тубус поднимают, объектив выходит из капли масла.
6. Масло с объектива удаляют чистой марлей и протирают жирорастворителем – либо ксилолом, либо спиртом, либо хлороформом. Оставлять масло на линзе объектива нельзя.
7. Револьверную часть на тубусе устанавливают на объектив $\times 8$, конденсор и тубус опускают, переводя в нерабочее состояние, и закрывают микроскоп колпаком.

3. Люминесцентная микроскопия.

Сущность метода. Некоторые биологические объекты способны при освещении коротковолновыми лучами (синими, фиолетовыми, ультрафиолетовыми) поглощать их и испускать лучи более длинной волной (светиться желто-зеленым или оранжевым светом). Это так называемая собственная или первичная люминесценция.

Нелюминесцирующие объекты можно обработать специальными флуорохромами и также наблюдать люминесценцию, но это уже будет наведенная вторичная люминесценция. Она используется в микроскопии чаще.

К флуорохромам относятся акридин желтый, акридин оранжевый, аурамин, примулин, тиофлавин, конго красный, тетрациклин, хинин и другие вещества (табл. 1).

Таблица 1

Флуорохромы для люминесцентной микроскопии,
используемые в микробиологических исследованиях*

Наименование красителя	Характеристика	Применение в бактериологии
Акридиновый желтый	Дихлоргидрат 3,6-диамино-2,7-диметилакридина	Выявление гонококков, туберкулезных микобактерий
Акридиновый оранжевый	Хлоргидрат 3,6-бидиметиламиноакрилина	Универсальный флуорохром для контрастирования ядер, нуклеиновых кислот
Аурамин	Хлоргидрат тетраметил-диаминобензофенона	Для выявления кислотоустойчивых бактерий (туберкулез, проказа), риккетсий и некоторых вирусов
Конго красный	Динатриевая соль бифенил-4, 4-бис (азо-2)-аминонафталин-4-сульфокислоты	Дополнительный краситель для контрастирования в комбинации с акридиновым оранжевым и др.
Нейтральный красный	Хлоргидрат 2-метил-3-амино-6-диметиламинофеназина	Флуорохром для выявления жиров и липоидов
Примулин	$C_2H_{14}N_3O_3S_3Na$	Для выявления элементарных тел вирусных и различия живых и мертвых клеток
Тиофлавин		
Трипафлавин	Смесь солянокислых солей хлорида 3,6-диамино-10-метилакридинума и 3,6-диаминоакридина	Флуорохром общего значения

Таблица 1 (окончание)

Наименование красителя	Характеристика	Применение в бактериологии
Флюоресцеин	Резорцин-фталейн	Краситель для люминесцентного анализа; для люминесцентной метки белков
Флюоресцеин-динатриевая соль (уранин)	-	Краситель для люминесцентного анализа и микроскопии (особенно для прижизненной люминесцентной микроскопии)
Фуксин основной	-	Дополнительный флюорохром для контрастирования с акридиновым оранжевым и др.
Эозин Н	Смесь динатриевых солей тетра-дибромфлюоресцеина	Для диффузного дополнительного флюорохромирования микроскопических препаратов

Примечание: * М.Н. Мейсель Люминесцентная микроскопия. – БМЭ, 2-е изд., т.16, с. 497-498.

Преимущества люминесцентной микроскопии по сравнению с обычной следующие:

- 1) цветное изображение и значительная контрастность исследуемых объектов;
- 2) возможность изучения морфологии живых и убитых клеток микроорганизмов в питательных средах и тканях животных и растений;
- 3) достижимость исследования клеточных микроструктур, избирательно поглощающих различные флюорохромы, которые являются как бы специфическими цитохимическими индикаторами;
- 4) доступность исследования как прозрачных, так и непрозрачных живых объектов;
- 5) изучение функционально-морфологических изменений клеток;
- 6) обнаружение и установление локализации отдельных микробов и вирусов;
- 7) использование флюорохромов при иммунологических реакциях и подсчете бактерий в образцах с невысоким их содержанием.

Окраска препаратов для люминесцентной микроскопии. Препарат для люминесцентной микроскопии готовят и фиксируют так же, как для обыкновенной микроскопии. Окрашивают препарат специальными красителями – флюорохромами, которые применяют в виде слабо концентрированных растворов (1:500-1:1000000). Растворы готовят на дистиллированной воде, изотоническом растворе хлорида

натрия или буферных смесях. Хранят приготовленные красители в темной банке, избегая действия света.

4. Электронная микроскопия.

Электронный микроскоп применяется для изучения объектов и структур, лежащих за пределами видимости светооптического микроскопа. Разрешающая способность современных электронных микроскопов 3-40 А°; рабочее увеличение в среднем 100 000 раз. Электронный микроскоп – своеобразная копия светового по схеме его построения. Однако освещение объекта обеспечивается потоком электронов, источником которых служит вольфрамовая нить, нагретая электрическим током.

Рассматриваемый предмет помещают между электромагнитными катушками, выполняющими функции проекционной и объективной линз. Электромагнитная катушка, играющая роль конденсорной линзы, собирает пучок электронов на наблюдаемом предмете, затем электроны попадают в «объективную линзу», дающую первое изображение предмета. Это изображение можно наблюдать на промежуточном экране. Часть электронов, проходя через диафрагму «объективной линзы», падает на «проекционную линзу». Увеличенное изображение, даваемое этой «линзой», принимается на флуоресцирующий экран – металлическую пластинку, покрытую тонким слоем сульфида цинка или сульфида цинка с селенидом кадмия. При попадании на экран электронных лучей частицы сульфида цинка начинают светиться. Чем они тонкодисперснее, тем четче детали строения объекта. Замещая экран фотографической пластинкой, изображение предмета можно сфотографировать.

Препараты для электронно-микроскопических исследований помещают на специальные сетки с нанесенной тончайшей пленкой (подложка). Общая толщина препарата и подложки не должна превышать 2500 А.

Контрастность объекта обеспечивается или напылением его тяжелыми металлами (хромом, золотом, палладием), или обработкой различными контрастирующими веществами типа фосфорно-вольфрамовой кислоты, уранилацетата.

При исследовании морфологических особенностей клеток микроорганизмов под электронным микроскопом исследуют целые клетки. При изучении ультраструктуры клеток делают их срезы. Толщина срезов не должна превышать 800-900 А.