

Тема 2

Морфология и ультраструктура бактерий, строение клеточной стенки. Приготовление мазков из патологического материала и чистой культуры микробов. Анилиновые красители. Простой метод окраски. Метод окраски по Граму.

Обсуждаемые вопросы:

- 1. Морфология бактерий (кокки, палочковидные, извитые и нитевидные бактерии).
- 2. Микроскопический метод исследования.
- 3. Этапы приготовления мазка.
- 4. Метод обезжиривания предметного стекла.
- 5. Приготовление мазка из гноя, мокроты, крови и культуры микробов.
- 6. Высушивание мазка.
- 7. Фиксация мазка (физическая, химическая, смешанная).
- 8. Анилиновые красители, их классификация по химическому составу и цвету.
- 9. Простой метод окраски.
- 10. Ультраструктура бактериальной клетки. Постоянные (нуклеоид, цитоплазма, рибосомы, клеточная оболочка – цитоплазматическая мембрана, клеточная стенка, слизистый слой) и непостоянные (капсула, внутриклеточные включения, жгутики, плазмиды, пили и споры) компоненты клетки.
- 11. Строение клеточной стенки бактерий, грамположительные и грамотрицательные бактерии.
- 12. Этапы окраски по методу Грама

Цель занятия:

- Дать информацию студентам о предмете «Медицинская микробиология и иммунология», ее цели и задачах, месте в медицинском образовании, ее отделах, значении во врачебной деятельности, разъяснить микроорганизмы, их основные группы, систематику и принципы классификации. Дать информацию о классификации бактерий. Объяснить роль микробиологической лаборатории в диагностике инфекционных заболеваний. Дать информацию о видах и устройстве микробиологических лабораторий, режиме работы в них. Разъяснить методы микробиологической диагностики. Ознакомить студентов с микроскопическим методом, типами современных микроскопов и правилами работы с иммерсионным объективом.

Общая характеристика бактерий

✓ Бактерии (греч. *bacteria* - палочка) одноклеточные, не видимые невооруженным глазом микроорганизмы

✓ Прокариоты

✓ Седиментация рибосом 70S

✓ Не имеют ядерной мембраны и ядрышка

✓ Имеют одну хромосому

✓ Митохондрии, лизосомы, аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум **отсутствуют**

✓ В цитоплазматической мембране отсутствуют стеролы (за исключением микоплазм)



Размеры бактерий

• **Длина бактерий**- варьирует от 1,5-3мкм (у микоплазмы 0,1-0,2мкм) до 10-15мкм (у возбудителя газовой гангрены 4-8 мкм).

• **Диаметр** - 0,6-0,8 мкм

• **Толщина**- 0,1- 2,5 мкм

$$1 \text{ мкм} = 10^{-6} \text{ м} = 10^{-3} \text{ мм}$$

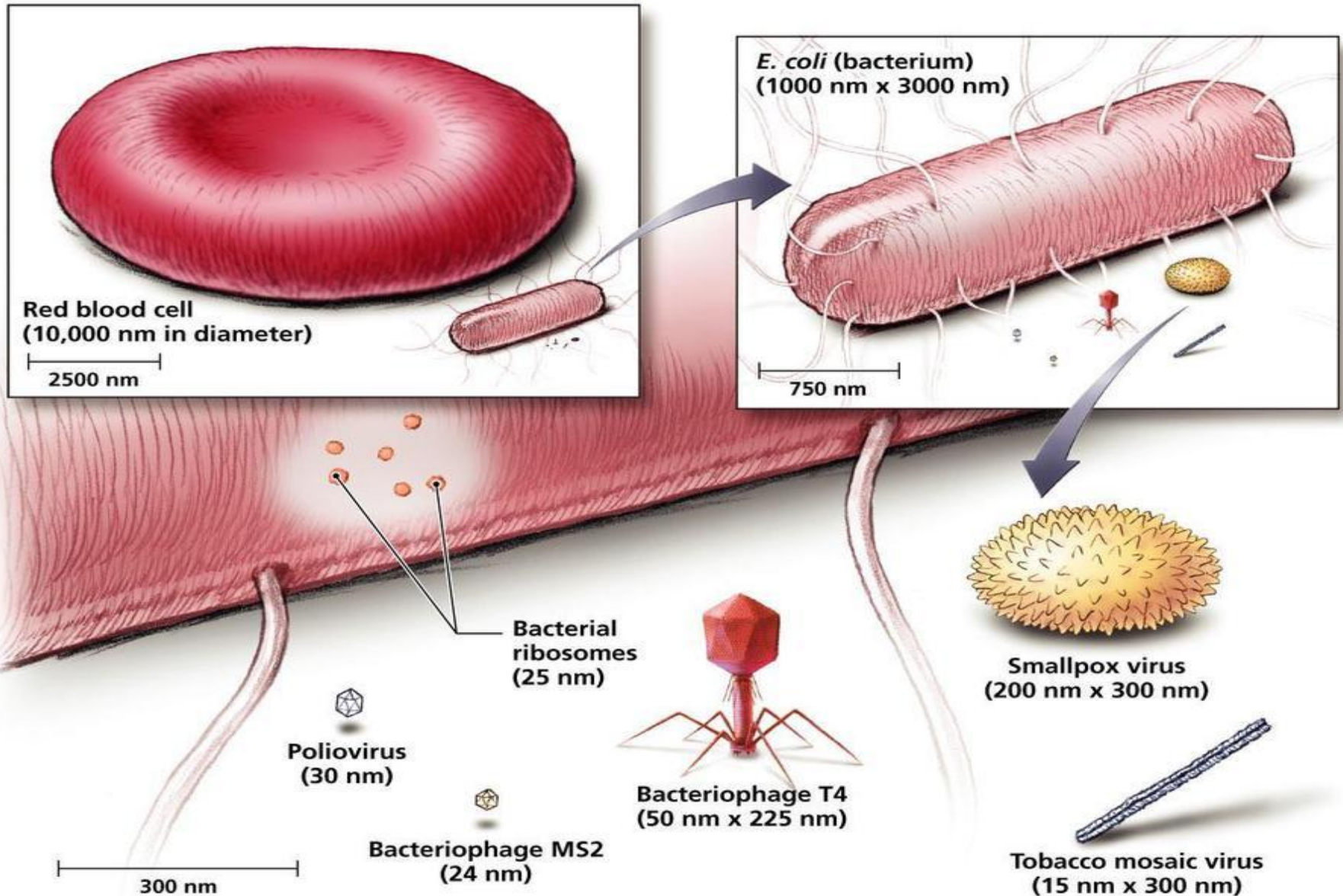
$$1 \text{ нм} = 10^{-9} \text{ м} = 10^{-6} \text{ мм}$$

$$1000 \text{ нм} = 1 \text{ мкм}$$

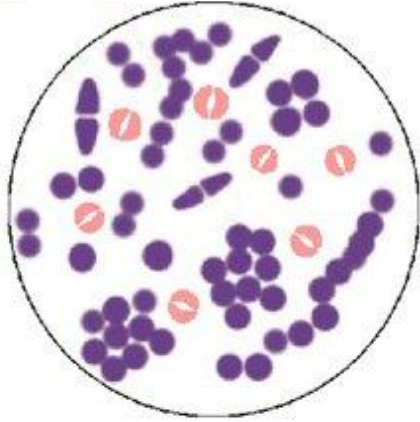
$$0.001 \text{ мкм} = 1 \text{ нм}$$



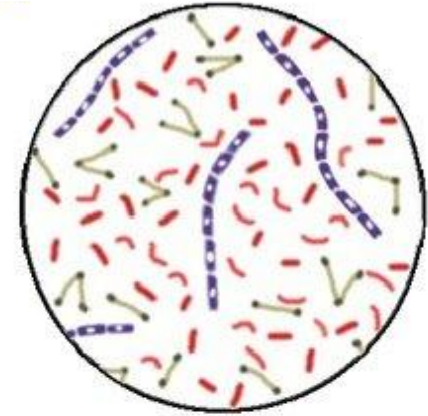
Размеры бактерий



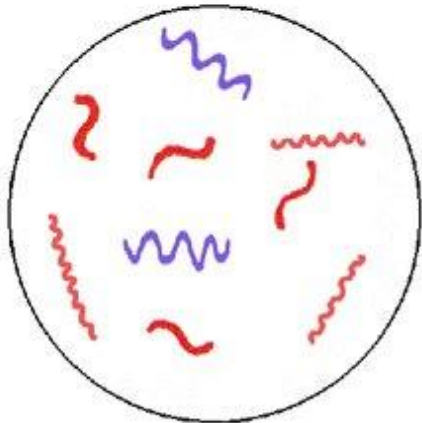
Морфология бактерий



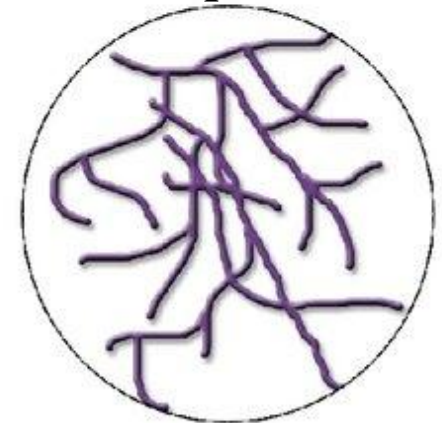
КОККИ



***Палочковидные
бактерии***



***Спиральные
бактерии***



Нитевидные бактерии

Кокки

Микрококки (греч. *micros* – **мелкий**) - делятся поперечно, располагаются отдельно

Диплококки (греч. *diplos* – **вместе**) - делятся поперечно, располагаются парами

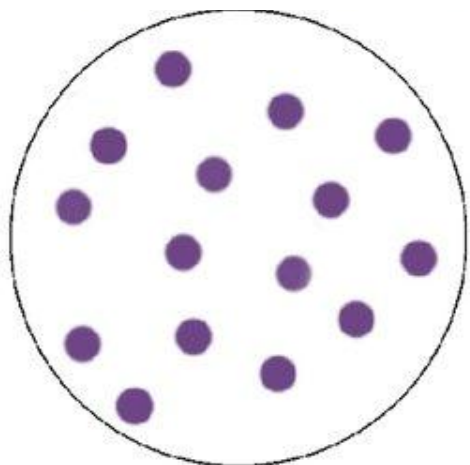
Стрептококки (греч. *Streptos* – **цепочка**) - делятся поперечно, располагаются в виде цепочек

Тетракокки (греч. *tetra* – **четыре**) - делятся перпендикулярно в двух плоскостях и располагаются по четыре

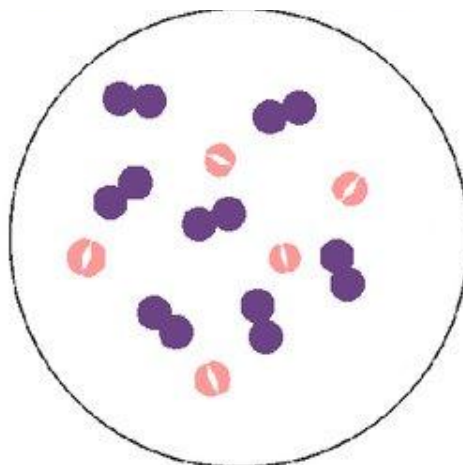
Сарцины (лат. *sarsina* – **сноп**) - делятся перпендикулярно в трёх плоскостях и располагаются в виде снопов

Стафилококки (греч. *staphyle*- **гроздь винограда**)- делятся перпендикулярно в двух плоскостях и располагаются в виде гроздей винограда

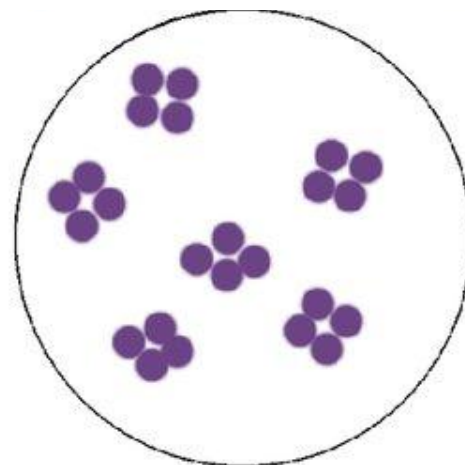
Сферические бактерии или кокки (0,5-1,5 мкм)



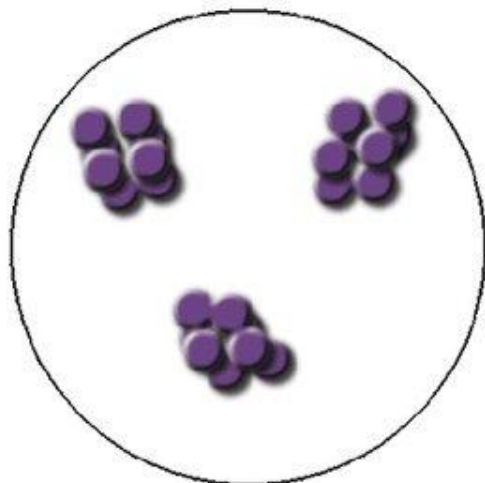
Micrococcus



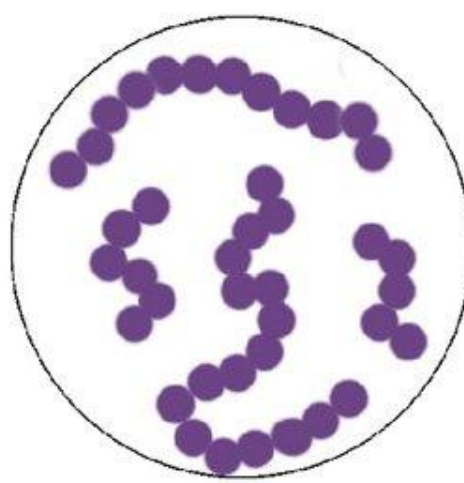
Diplococcus



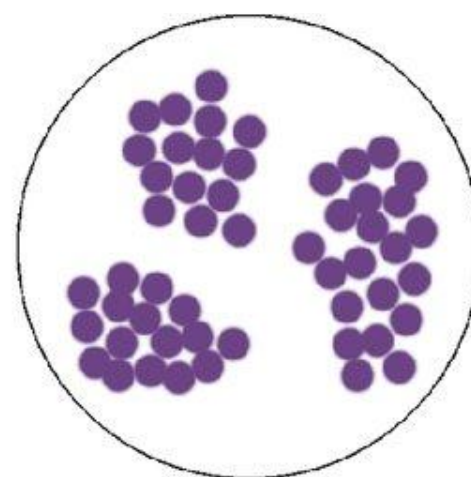
Tetrads



Sarcina



Streptococcus



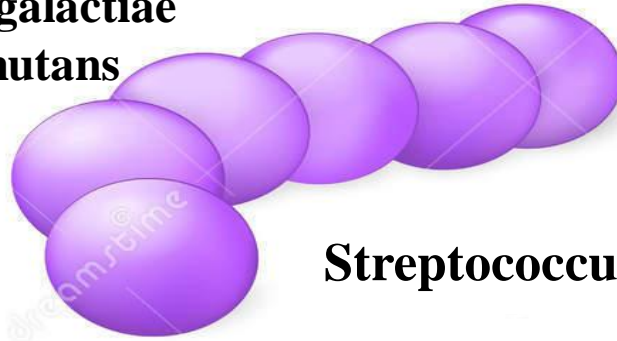
Staphylococcus

KOKKI



Micrococcus

**S.pyogenes
S.agalactiae
S.mutans**



Streptococcus

Diplococcus



**N.meningitidis
N.gonorrhoeae
S.pneumonia**



Sarcina



Tetracoccus



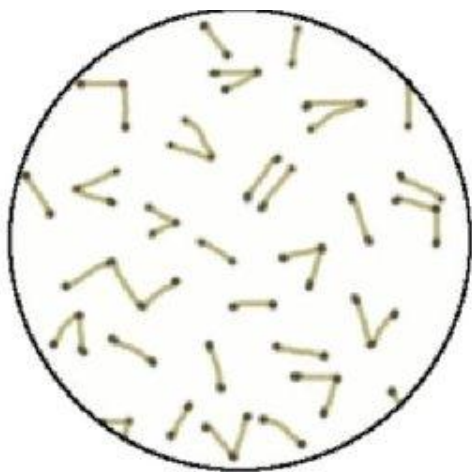
**Staphylococcus aureus
S.epidermidis,
S.saprophyticus**



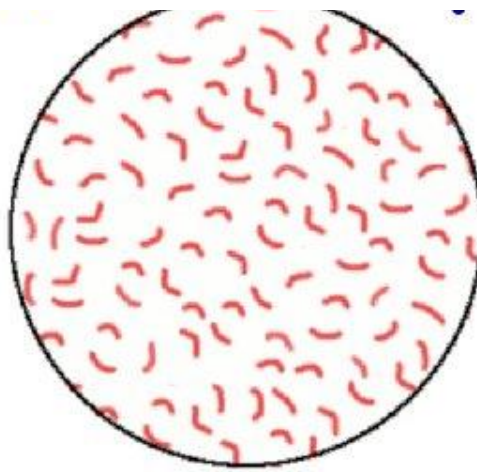
Палочковидные бактерии:

- Палочковидные бактерии или палочки имеют прямоугольные формы.
- По расположению:
 - одиночное хаотичное – кишечная палочка
 - cüt-cüt (диплобациллы) - klebsiella
 - цепочки(стрептобациллы) – возбудитель сибирской язвы
- Çöpvari bakteriyaların hüceyrələrinin **ucları**:
 - girdə
 - обрубленные
 - sivriləşmiş (fuzibakteriyalar)
- Çöpvari bakteriyalar **en ölçülərinə** görə:
 - basil (spor əmələ gətirən aerob çöpvari bakteriyalar)

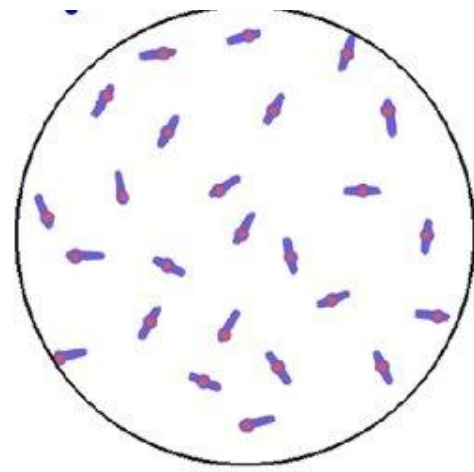
Палочковидные бактерии (0,3-10 мкм)



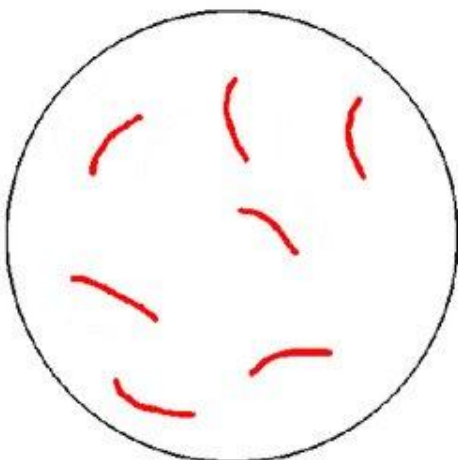
коринебактерии



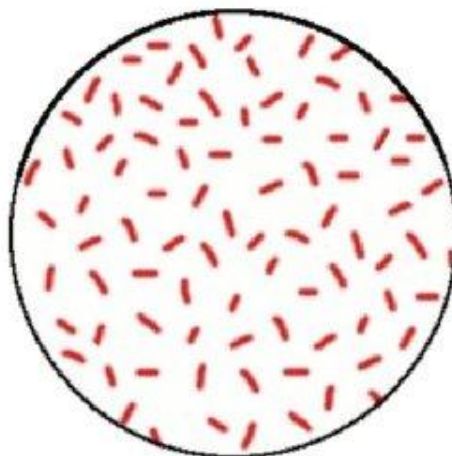
вибрионы



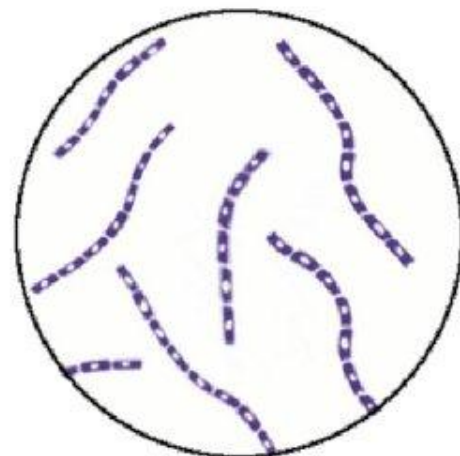
кlostридии



микобактерии



эшерихии



стрептобациллы

Палочковидные бактерии

1. эшерихии

2. клебсиеллы

3. бруцеллы

4. бациллы

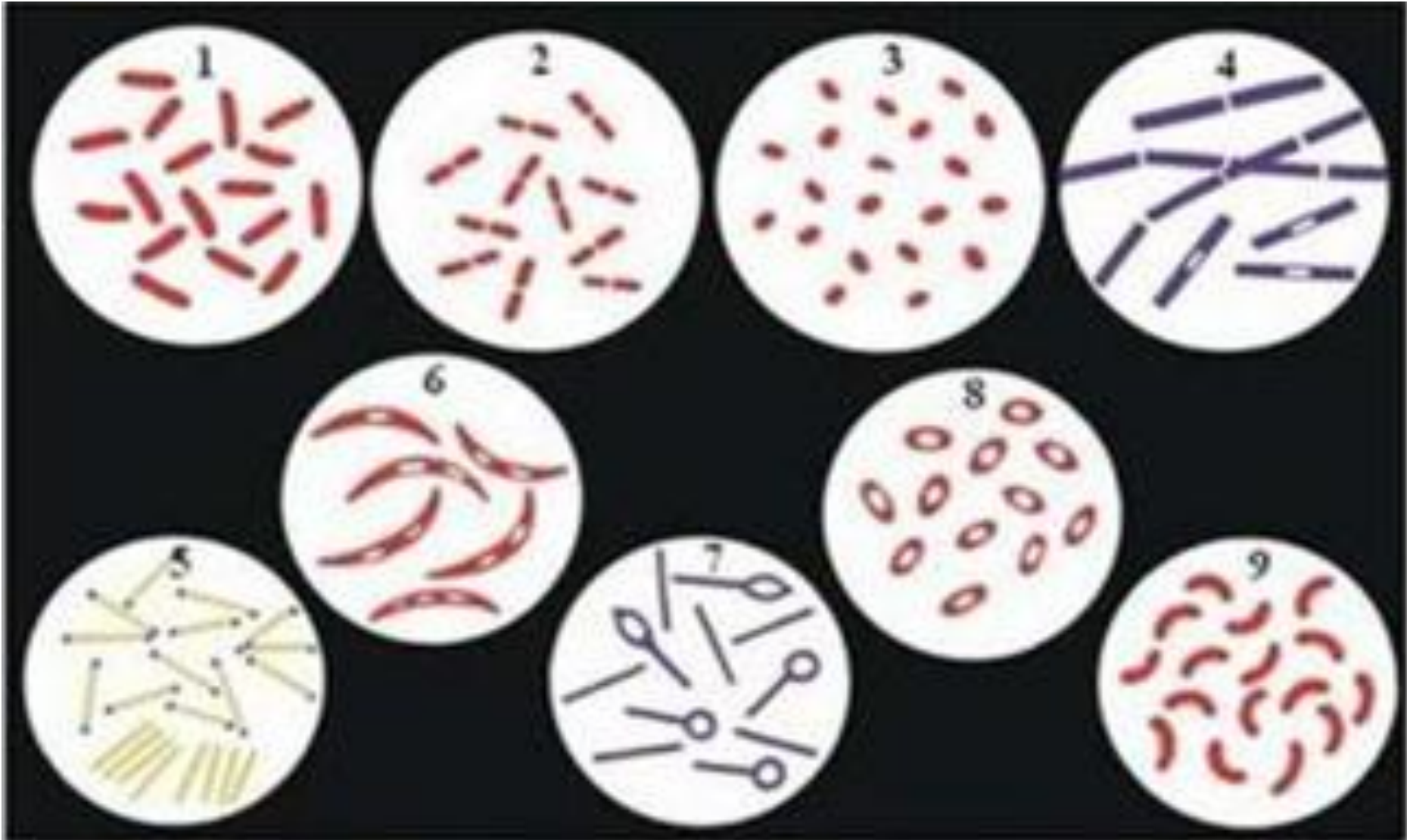
5. коринебактерии

6. фузобактерии

7. клостридии

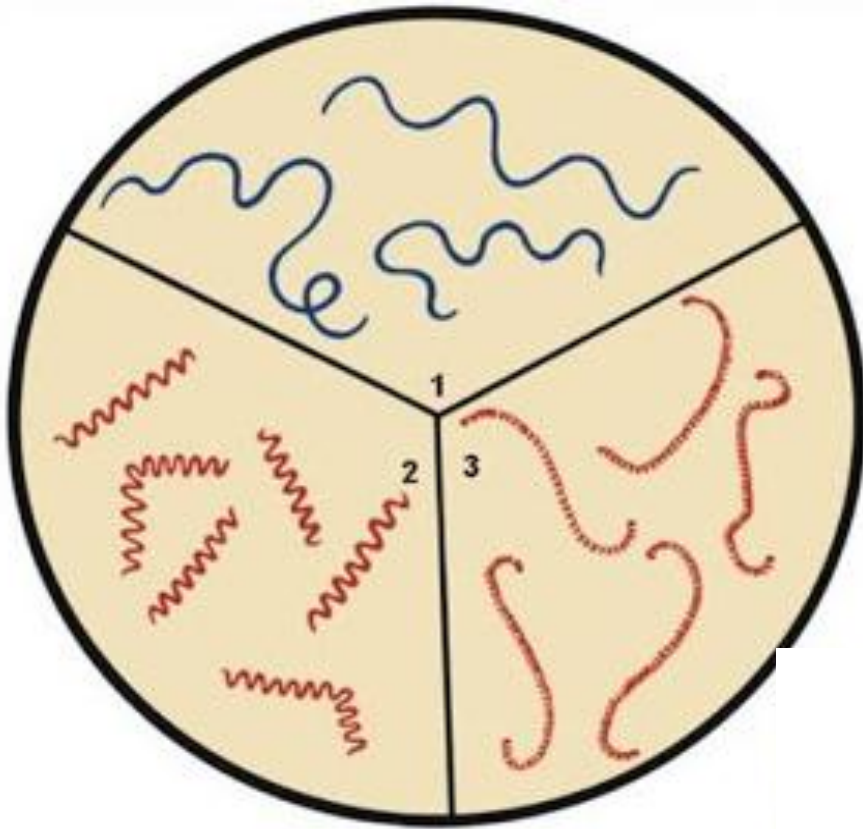
8. иерсинии

9. вибрионы



Спиралевидные бактерии (<20 мкм)

- *Спириллы*
- *Спирохеты*



1. *Боррелии*
2. *Трепонемы*
3. *Лептоспиры*



кампилобактерии

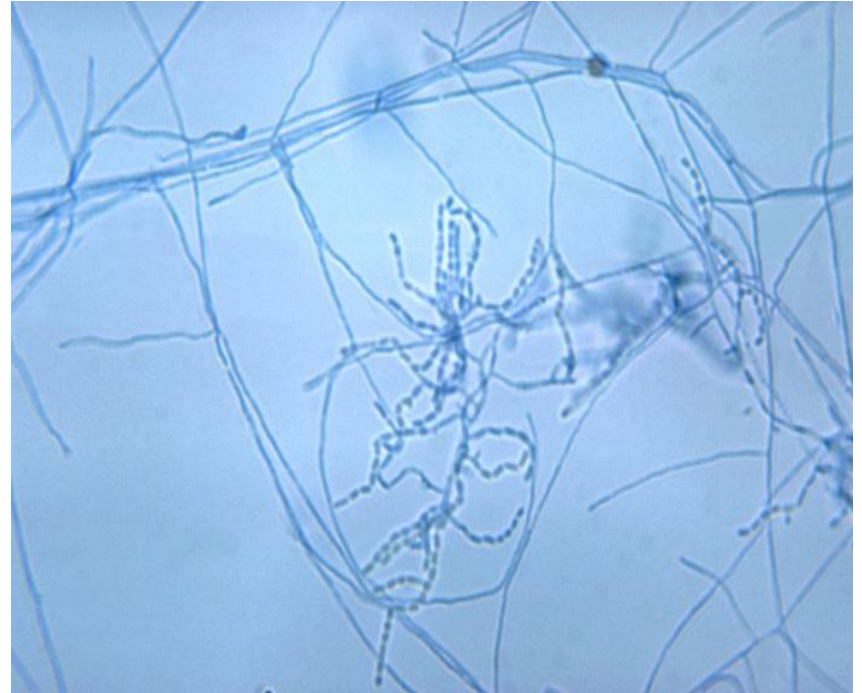


Helicobacter pylori

Нитевидные бактерии(10-50 мкм)



Актиномицеты



Микроскопический метод исследования

- *Микроскопический метод* —основывается на распознавании возбудителей по их морфологическим признакам
- Метод позволяет выявлять возбудителей в патологических материалах, полученных от больных, в нативных или окрашенных мазках путем их микроскопирования
- В нативных или окрашенных мазках, приготовленных из микробных культур морфологические свойства возбудителей изучают с помощью микроскопирования (морфологическая идентификация)

Этапы приготовления мазка

Обезжиривание предметного стекла

Новое предметное стекло кипятят в **1% растворе соды**, промывают водой, выдерживают в слабом **растворе хлорной кислоты** и вновь промывают

■Использованные предметные стекла выдерживают два часа в концентрированном растворе серной кислоты или водном растворе бихромата калия (100:50:1000), промывают водой, кипятят в растворе соды, промывают водой и протирают

■Обезжиривание возможно с использованием сухого мыла и дальнейшим протиранием маревой салфеткой

■При приготовлении мазка для обезжиривания предметного стекла используют пламя горелки

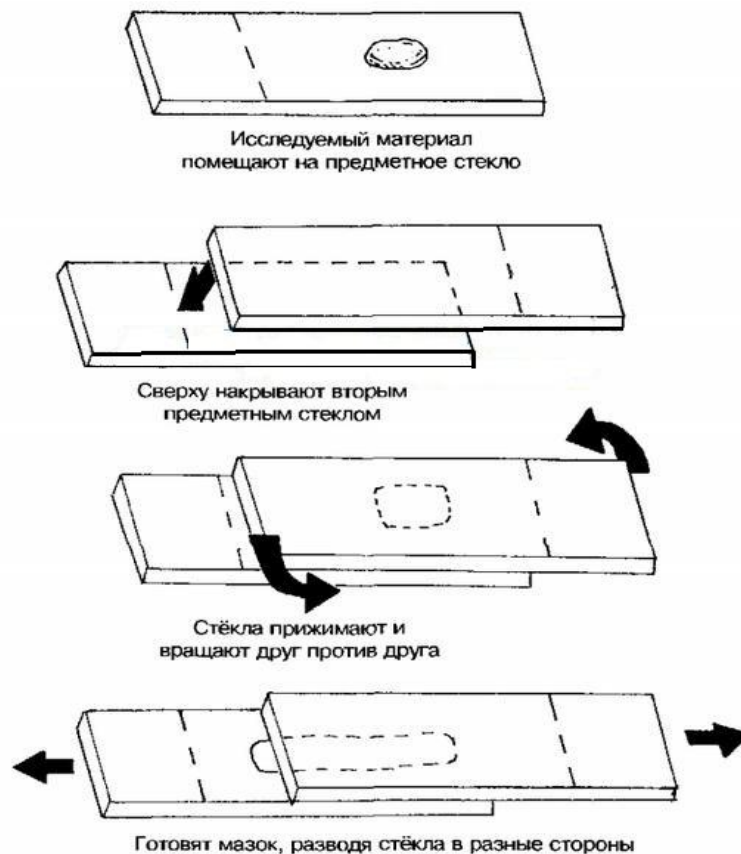


**приготовление мазков из патологического
материала пациентов**

Приготовление мазка из гноя и мокроты

Для приготовления мазка из гноя и мокроты обезжиривается оба предметных стекла.

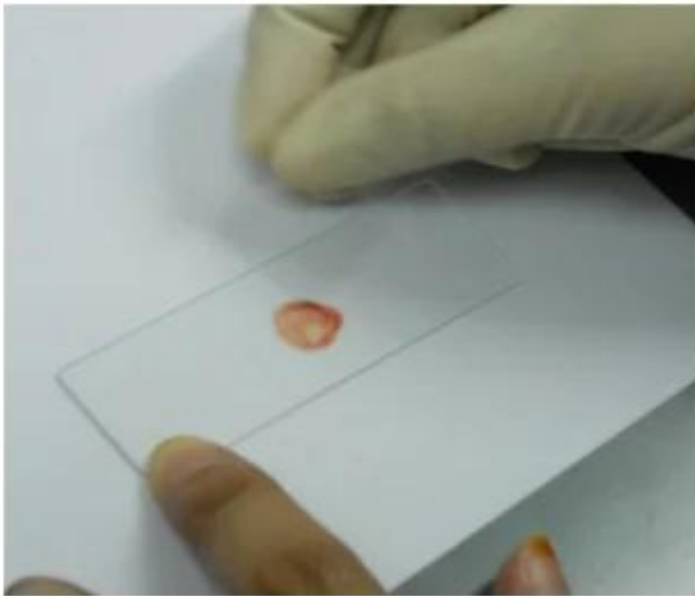
На одно стекло петлёй наносится одна капля материала и накрывается сверху вторым предметным стеклом, слегка придавливается, ткани и материал раздавливаются и мазок готовится движением в обратном направлении.



Из крови готовится два вида мазка:

➤Препарат «толстой» капли –для его приготовления на предметное стекло наносят 1-2 капли крови и размазывают петлёй мазок диаметром 1 см.

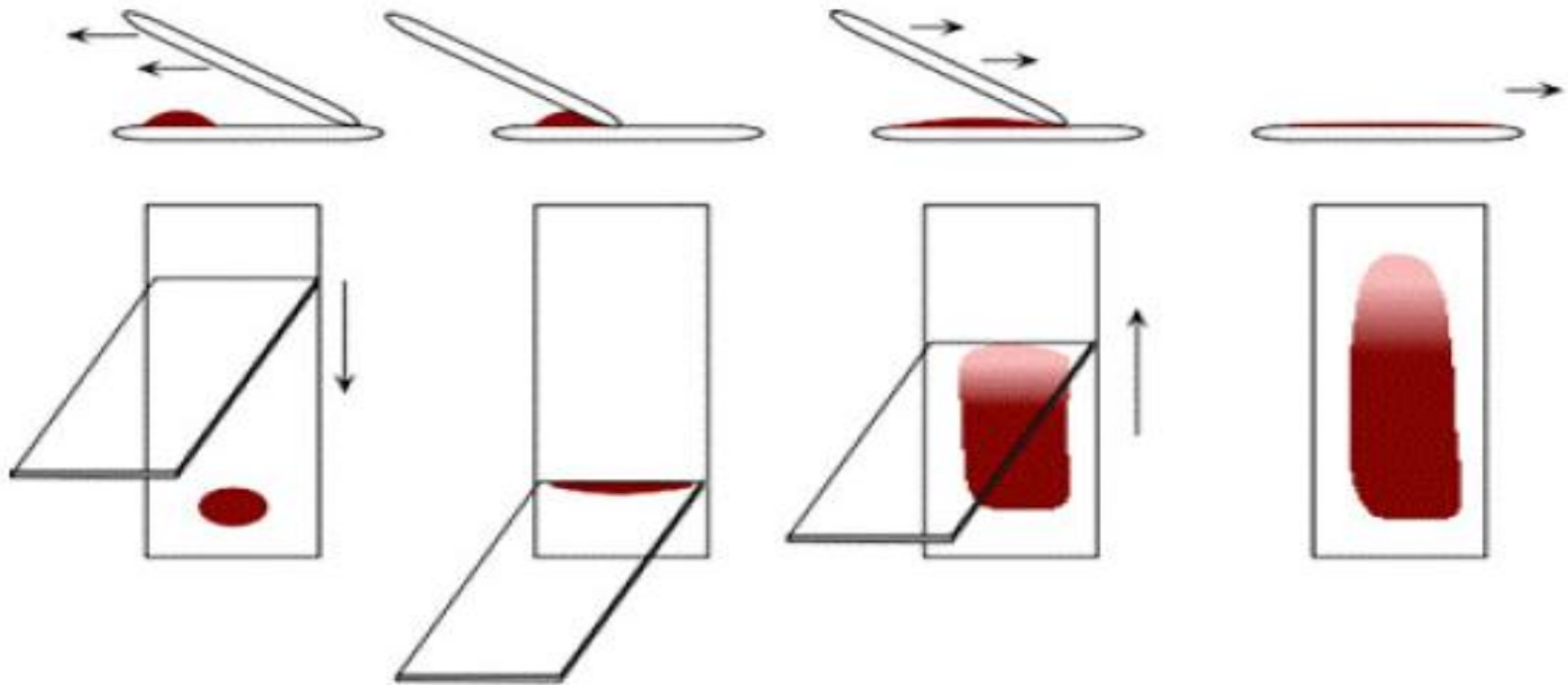
➤Применяется для обнаружения в крови паразитов.



Из крови готовится два вида мазка:

➤ *“Тонкий” мазок крови* – на одну сторону обезжиренного предметного стекла наносят 1 каплю крови, затем распределяют вторым стеклом под углом 45°.

➤ *Позволяет определить вид возбудителя.*

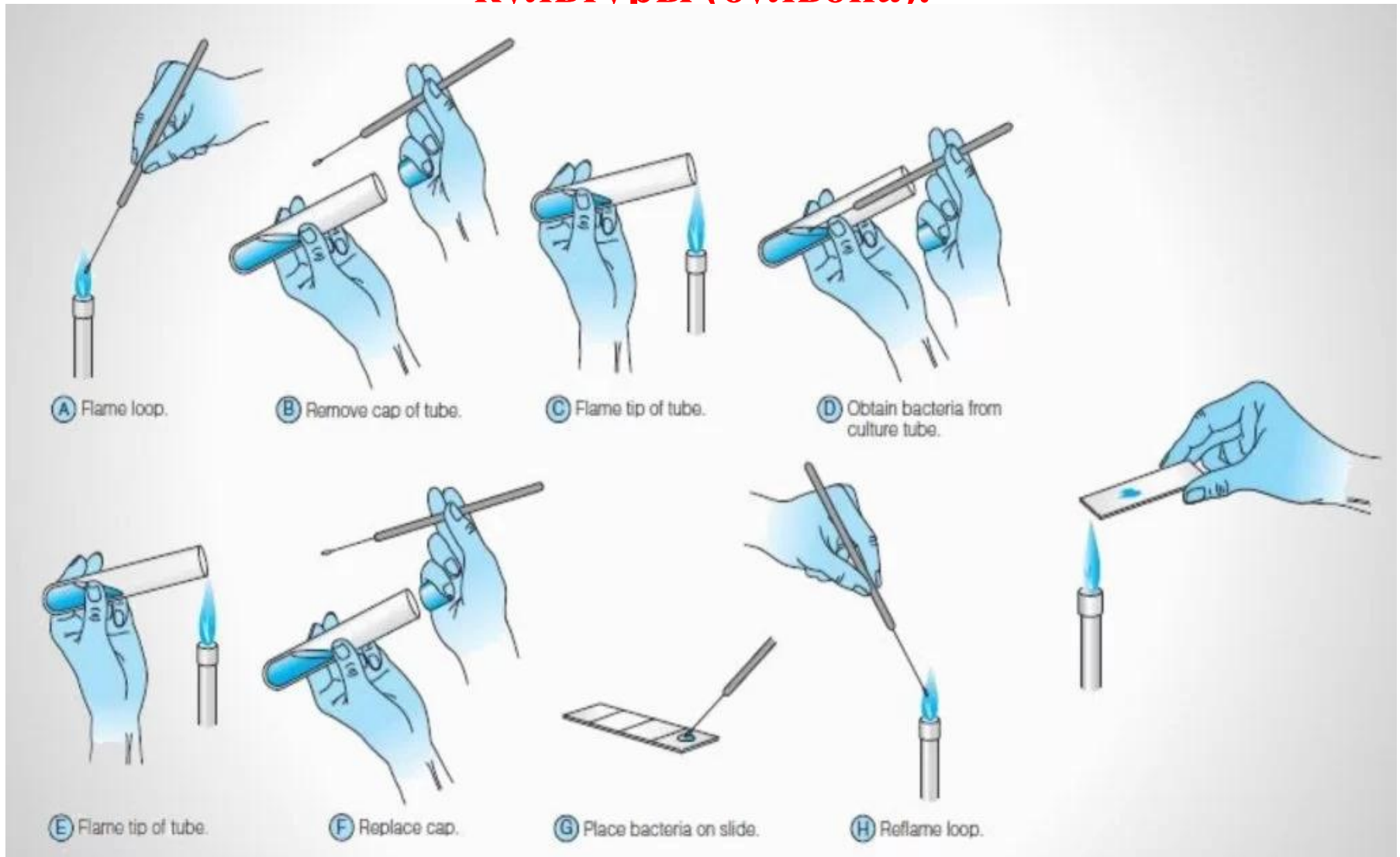


Приготовление мазков из бактериальных культур

Үахманнн һазрланмасыннн мәрһәләләрі:

1. Бактериологическая петля, которую держат в правой руке, раскаляют в пламени.
2. На обезжиренное предметное стекло наносится 1 капля физиологического раствора.
3. Пробирку с микробной культурой держа в левой руке (при условии, что поверхность питательной среды видна), при помощи указательного пальца и ладони правой руки снимается пробка, и пробирку с пробкой пропускают через пламя горелки.
4. При помощи Петли берется материал из пробирки.
5. Пробирку с пробкой пропускают через пламя, закрывают.
6. Микробную культуру на конце петли смешивают с физиологическим раствором в диаметре 1 см на поверхности покровного стекла.
7. Бактериологическая петля стерилизуется в пламени

Методика приготовления мазка из бактериальной культуры (бульона).



Микроскопический метод исследования

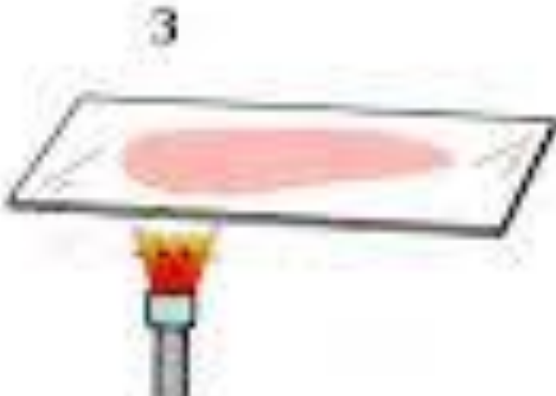
Этапы приготовления мазка



На предметное стекло наносится капля воды (физ. раствора)



К капле добавляется биологический материал и перемешивается



Высушивается и фиксируется



Сверху добавляется краситель и окрашивается

Высушивание мазков

- *Мазки, в основном, высушивают открыто при комнатной температуре*
- *Толстые мазки высушивают в термостате либо над пламенем горелки.*
- *Мазок нужно держать большим и указательным пальцами правой руки поверхностью вверх.*
- *При пересушивании клеточные структуры разрушаются*
- *Препараты, приготовленные из крови нужно высушивать при комнатной температуре.*

Фиксация мазка (физическая, химическая, смешанная)

1. Мазок фиксируют на предметное стекло, чтобы он не удался при смывании и окрашивании.

Для обезвреживания микробов. Кроме того, убитые микробы окрашиваются лучше, чем живые.

3. Становятся безопасными для лаборанта и окружающих

Физико-термическая фиксация - мазок трижды проводят через пламя.

Химическая фиксация: метиловый спирт--5 мин, этиловый спирт и смесь Никифорова 10 мин, на пару осмиевой кислоты – 2-3 мин, в растворе формалина несколько секунд, в ацетоне 5 минут

Для фиксации крови и отпечатков органов..

Физико-химическая – смешанная фиксация



Приготовление мазка из бактериальной культуры



Окрашивание мазков

Тинкториальные свойства бактерий

- *Тинкториальные свойства – способность бактерий впитывать красители*
- *Используется для морфологической идентификации бактерий*

Анилиновые красители.

Растворы красителей и их приготовление.

➤ *Химические красители получают на основе угля, они называются анилиновыми красителями*

➤ *Чаще используется основные красители.*

➤ *Основные красители окрашивают клеточное ядро, а кислотные — протоплазму клеток.*

Кислые

- *Кислый фуксин*
- *эозин*

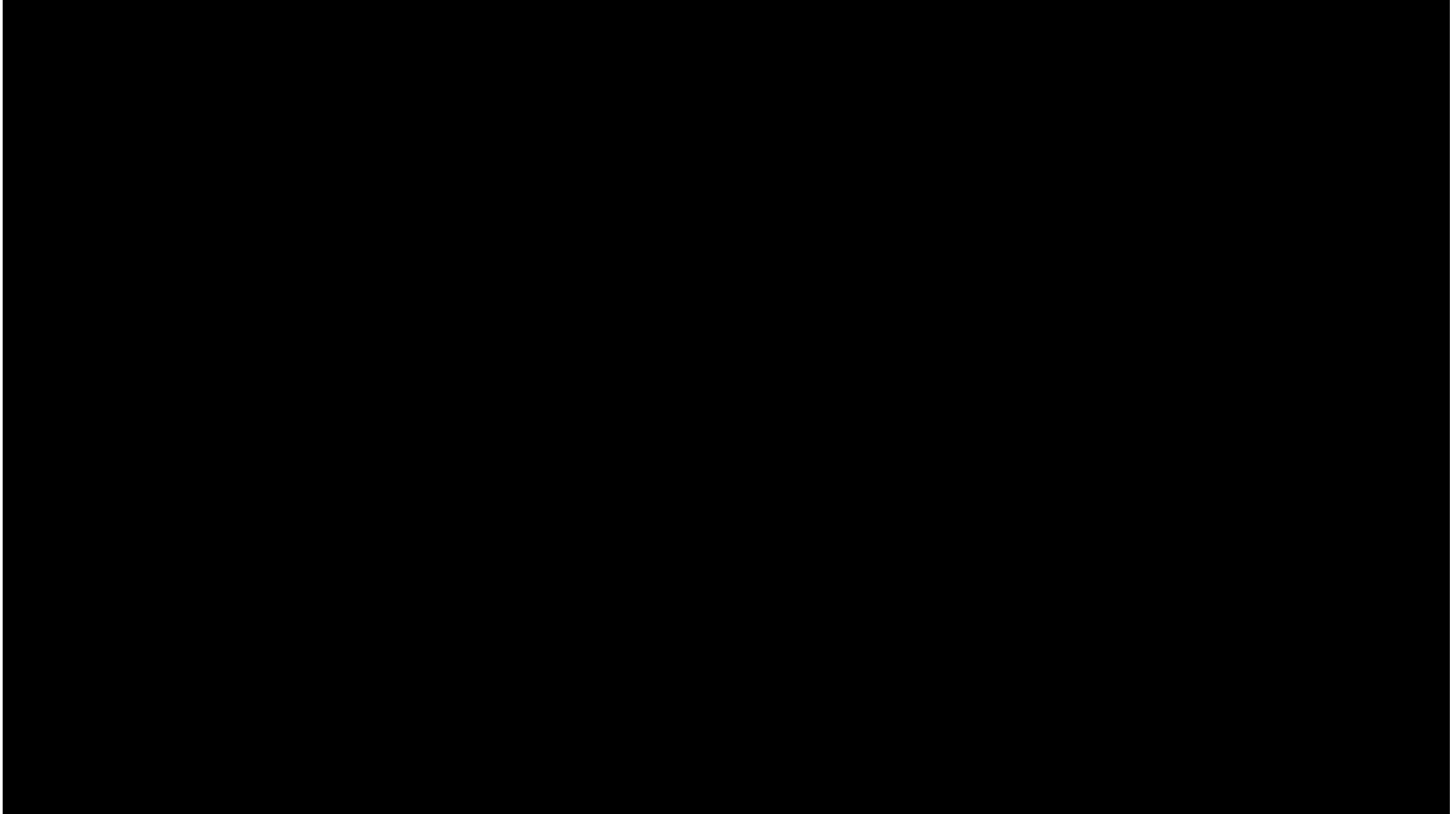
Щелочные

- *Метиленовая синька, фуксин, шафранин, нейтрал-рот, генциан-виолет, хризоидин.*

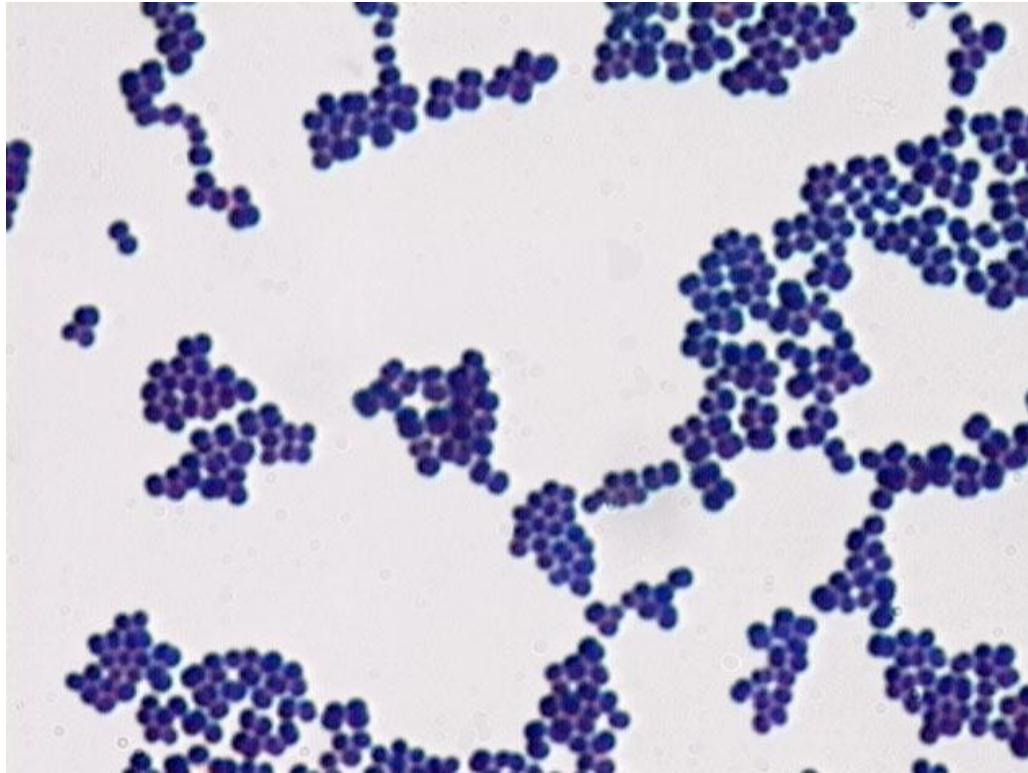
Простой метод окраски

- *Методы окраски подразделяются на **простые** и **сложные***
- *При **простом методе** окраски используется всего один краситель.*
- *- **фуксин Пфейффера** (водный фуцин) - **1-2 мин.***
*- **метиленовый синий** - **3-5 мин.***
- *Такой способ подходит для изучения морфологии микробов.*
- *В исследуемом материале определяется наличие микроба, его количество и расположение*

Простой метод окраски

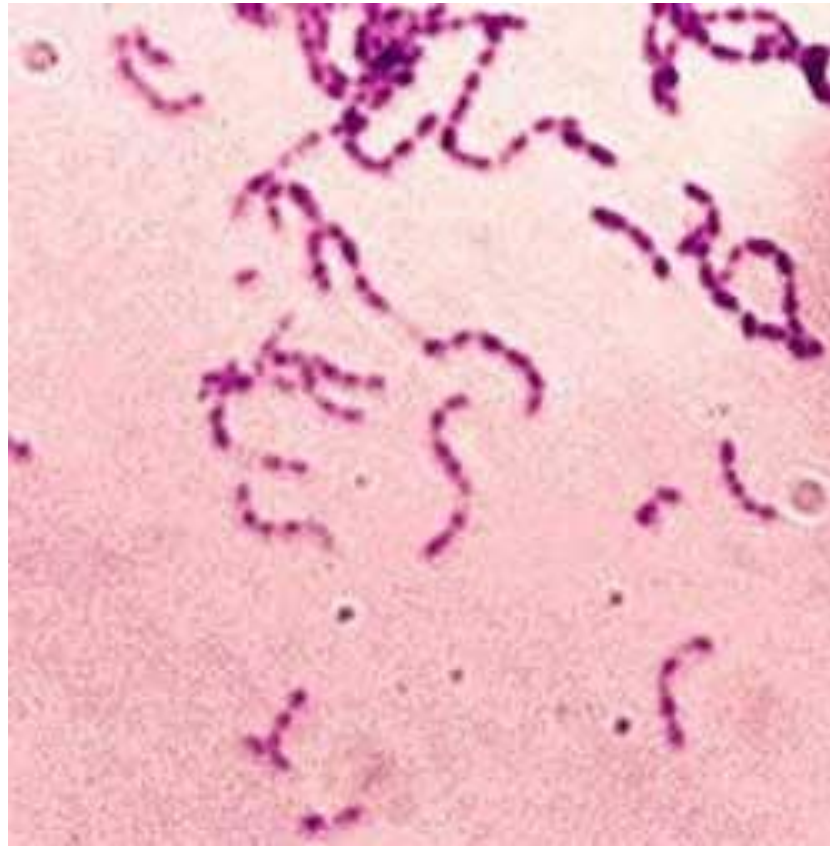


Простой метод окраски



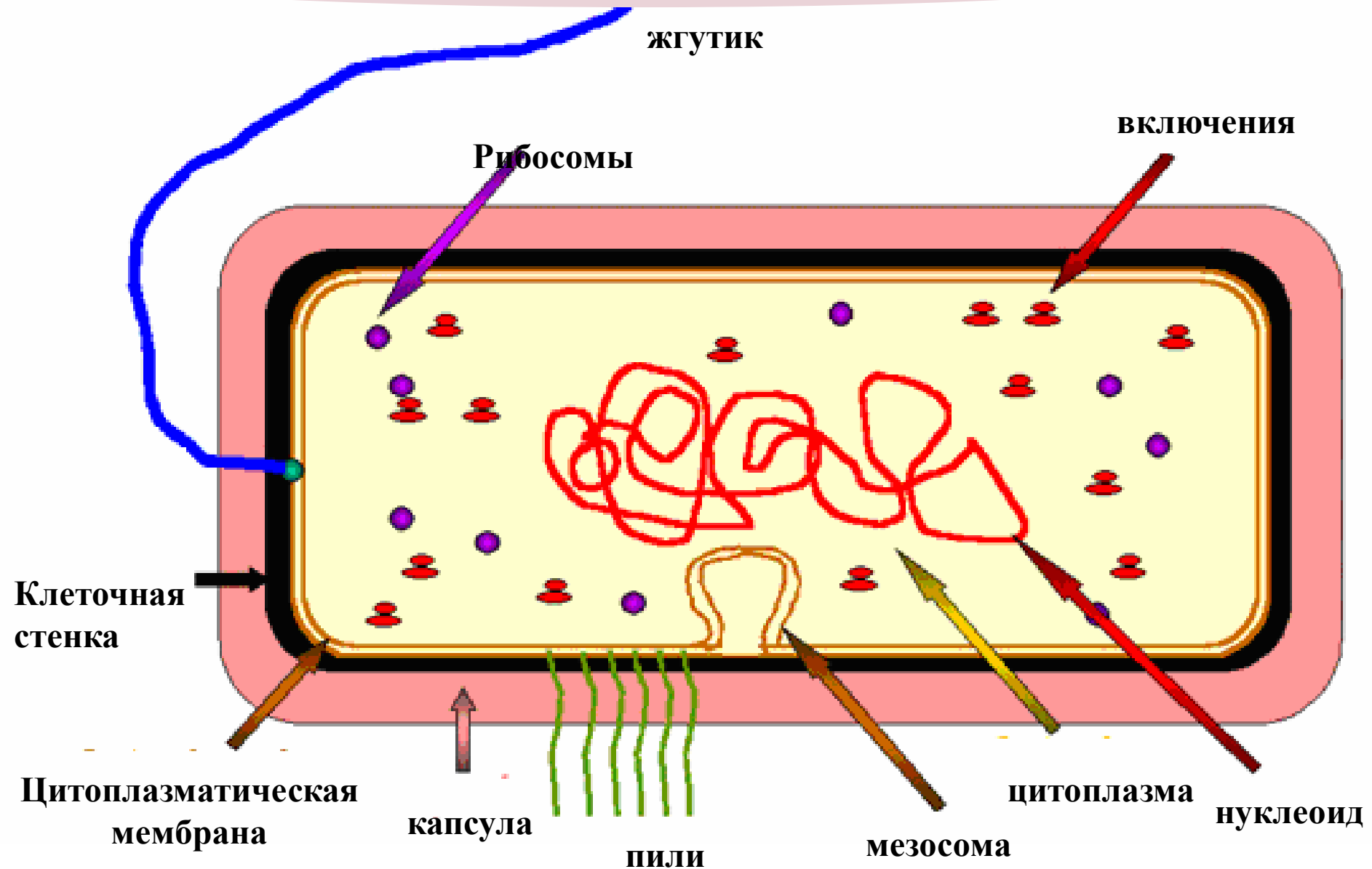
*Окраска метиленовой синькой
(3-5 минут)*

Простой метод окраски

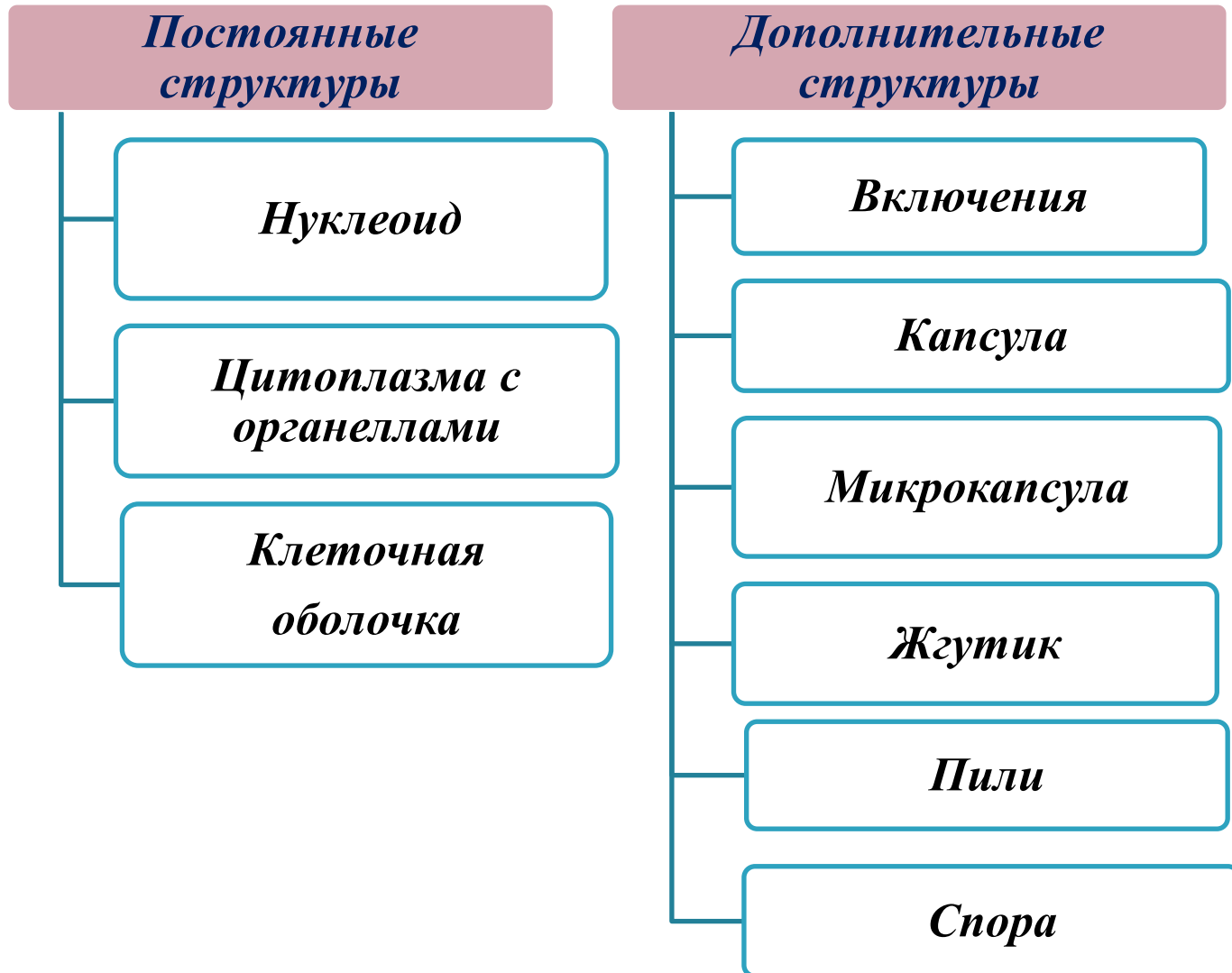


Окраска водным фуксином (1-2 минуты)

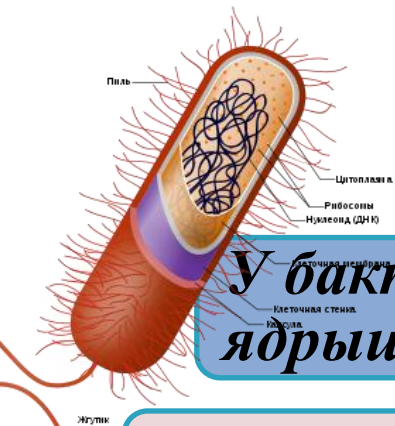
Ультраструктура бактериальной клетки



Строение бактериальной клетки



Нуклеоид



У бактерий отсутствуют ядро, ядерная мембрана, ядрышко и гистоны

Располагается в цитоплазме, состоит из 10 млн н.п.

Обычно в клетке содержится одна гаплоидная хромосома, представленная замкнутой в кольцо двунитовой ДНК

*у *Borrelia burgdorferi* ДНК линейная*

Помимо хромосомы имеются внехромосомные факторы наследственности - плазмиды

Выявляют нуклеоид по методу Фёльгена и Гимзы

Цитоплазма и внутрицитоплазматические включения

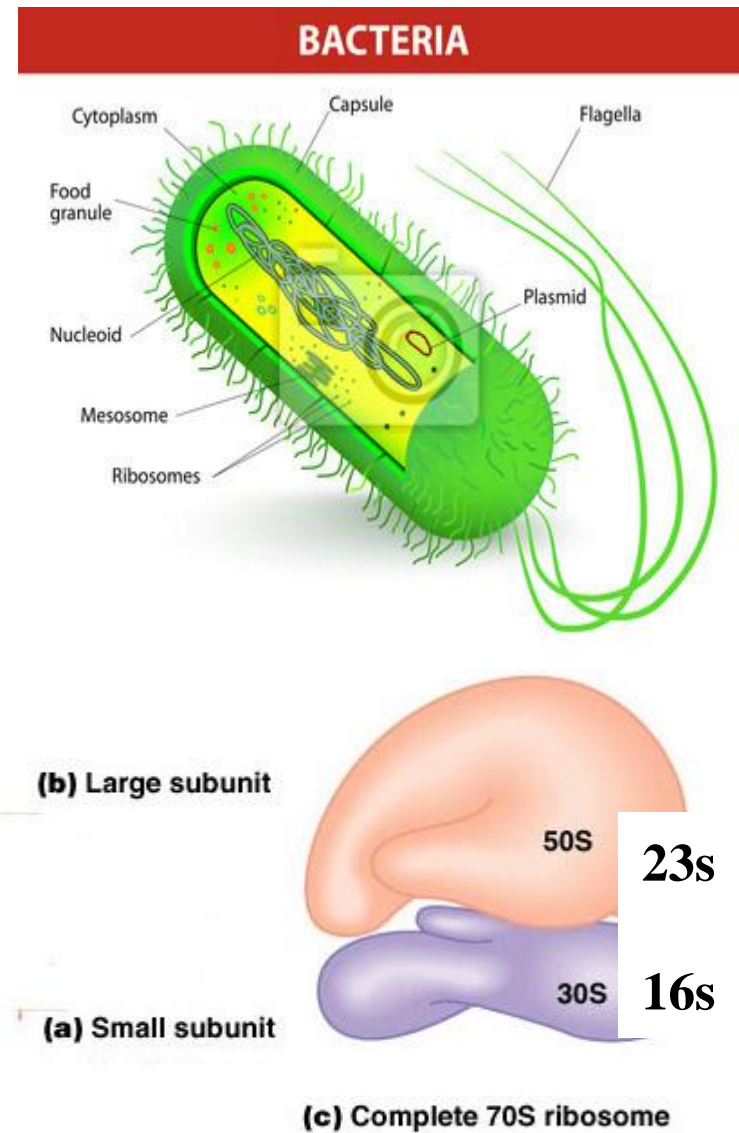
➤ **Цитоплазма** коллоидный матрикс, содержит растворимые белки, включения и рибосомы (РНК)

➤ **Рибосомы** бактерий имеют размер около 20нм, коэффициент седиментации 70S (50S и 30S – единица Сведберга)

➤ 23S-рРНК входит в состав 50S

➤ 16S-рРНК входит в состав 30S

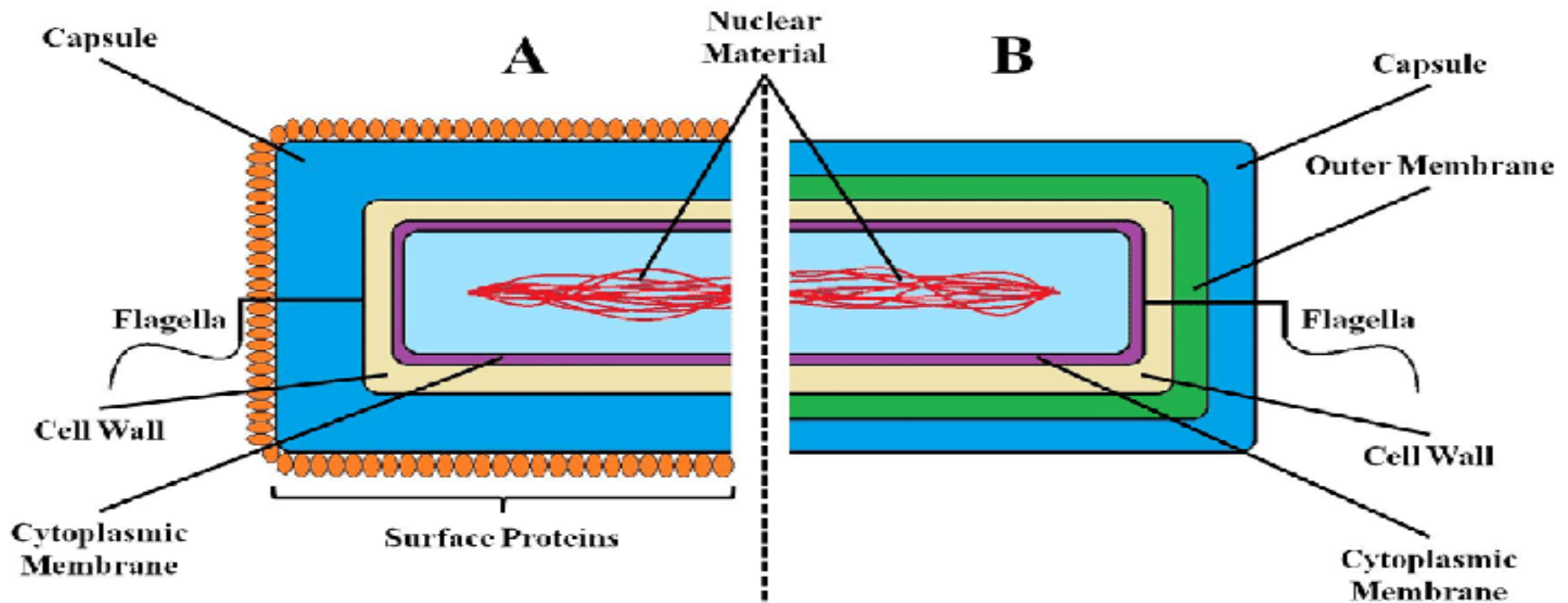
➤ В качестве запасных питательных веществ и источника энергии в цитоплазме накапливаются различные включения (гранулы гликогена, полисахариды, липиды и полифосфаты)



Оболочка бактериальной клетки

Оболочка бактериальной клетки включает:

- ❖ Цитоплазматическую мембрану
- ❖ Клеточную стенку
- ❖ Слизистый слой- капсула, микрокапсула, гликокаликс



Функции цитоплазматической мембраны

✓Регуляция осмотического давления

✓Трансмембранные белки участвуют в передаче сигналов, липидные слои обуславливают биологические свойства.

✓Обладает избирательной проницаемостью.

✓Обуславливает перенос веществ посредством активного транспорта

✓Использует для дыхания систему транспорта электронов.

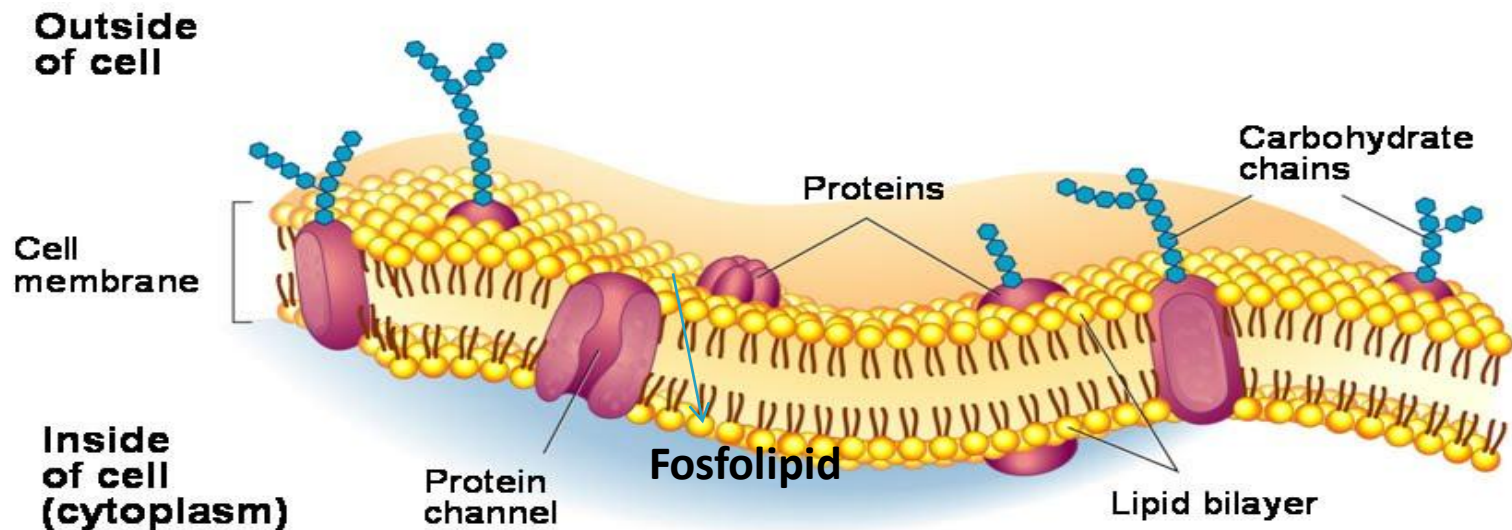
✓Участвует в переносе биосинтетических и гидролитических ферментов, транспортных и сигнальных белков.

✓Имеет специфические участки для связывания с хромосомой и плазмидами.

✓Внутренние слои ЦПМ содержат актиноподобные белковые волокна, определяющие морфологию бактерий. Эти волокна обеспечивают спиралевидную форму трепонем.

Цитоплазматическая мембрана

- Не содержит стеролов (за исключением микоплазм)
- Состоит из билипидного слоя (фосфолипиды) и встроенных мембранных белков
- Основная функция - энергетический синтез и транспорт электронов
- Содержит транспептидазу (пенициллинсвязывающий белок)
- **мезосомы** → впячивания мембраны внутрь цитоплазмы
(у грамположительных бактерий выполняют функцию митохондрий)
- центральная мезосома → репликация ДНК
- латеральная мезосома → синтез белков-ферментов



Клеточная стенка

Защитный слой окружающей цитоплазматическую мембрану

- *Придает форму бактериальной клетке*
- *Выполняет барьерную функцию*
- *Предохраняет клетку от осмотического лизиса*
- *Обеспечивает взаимодействие с клеткой хозяина*
- *Обнаруживается по методу Грама*
- *Играет роль в патогенезе бактериальных инфекций*

Клеточная стенка

- **Клеточная стенка** бактерий имеет толщину 15–20 нм и составляет 20-30% сухого остатка
- Клеточная стенка — прочная структура, придающая бактерии определенную форму, имеет сложное строение и состоит из нескольких слоев
- Различное отношение к окраске по методу Грама , и подразделение бактерий на две группы – **грамположительные** и **грамотрицательные** основывается на различие в строении их клеточной стенки

Строение клеточной стенки грамположительных бактерий

✓С пептидогликаном клеточной стенки ковалентно связаны **тейхоевые кислоты** (от греч. *teichos*-стенка).

✓Молекулы тейхоевых кислот являются полимерами **глицеролфосфата и рибитолфосфата**.

✓Тейхоевые кислоты растворимы в воде.

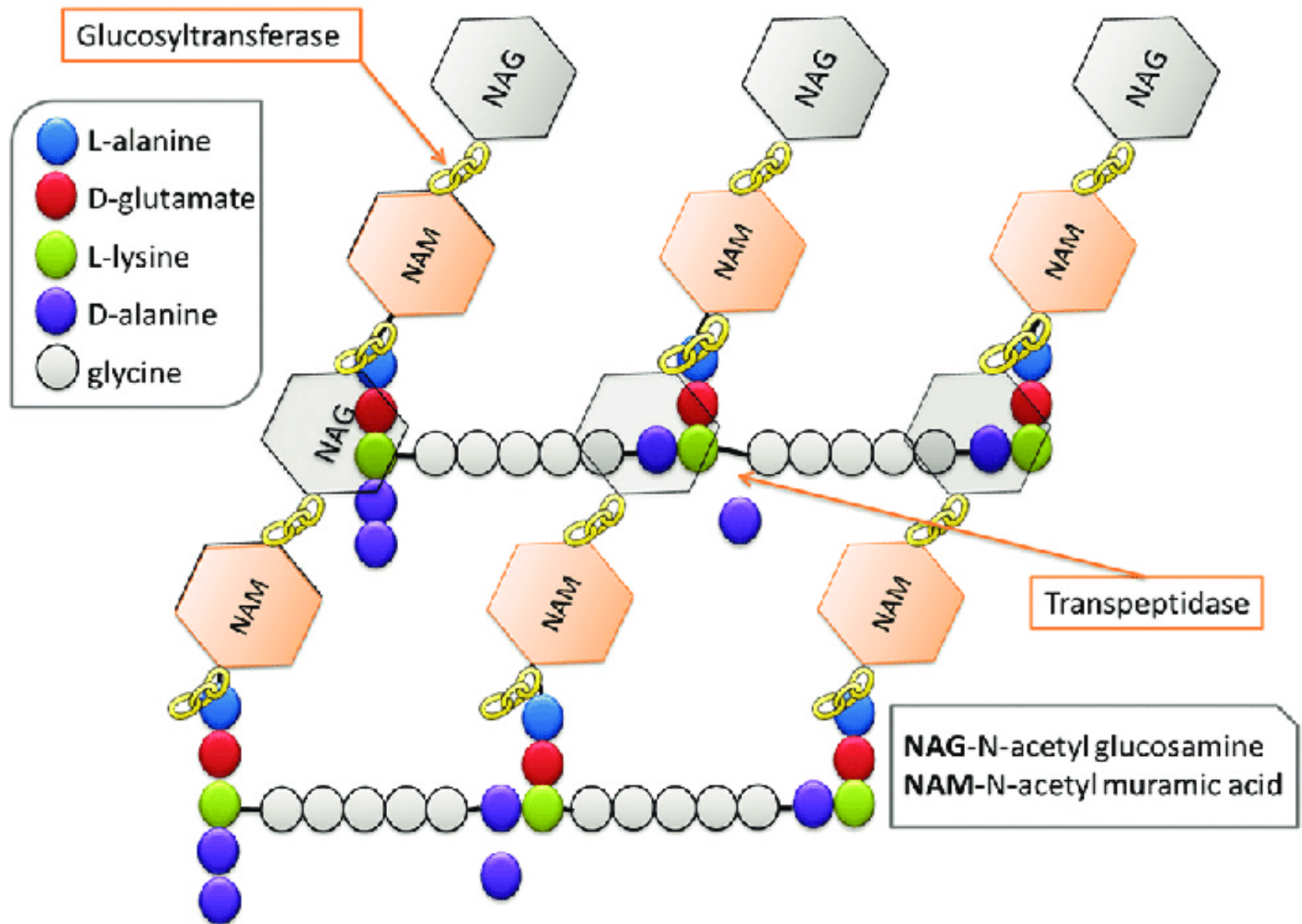
✓Тейхоевые кислоты участвуют в делении клетки, в регуляции синтеза и распада клеточной стенки, в адгезии на клетках организма.

✓Являются фактором патогенности.

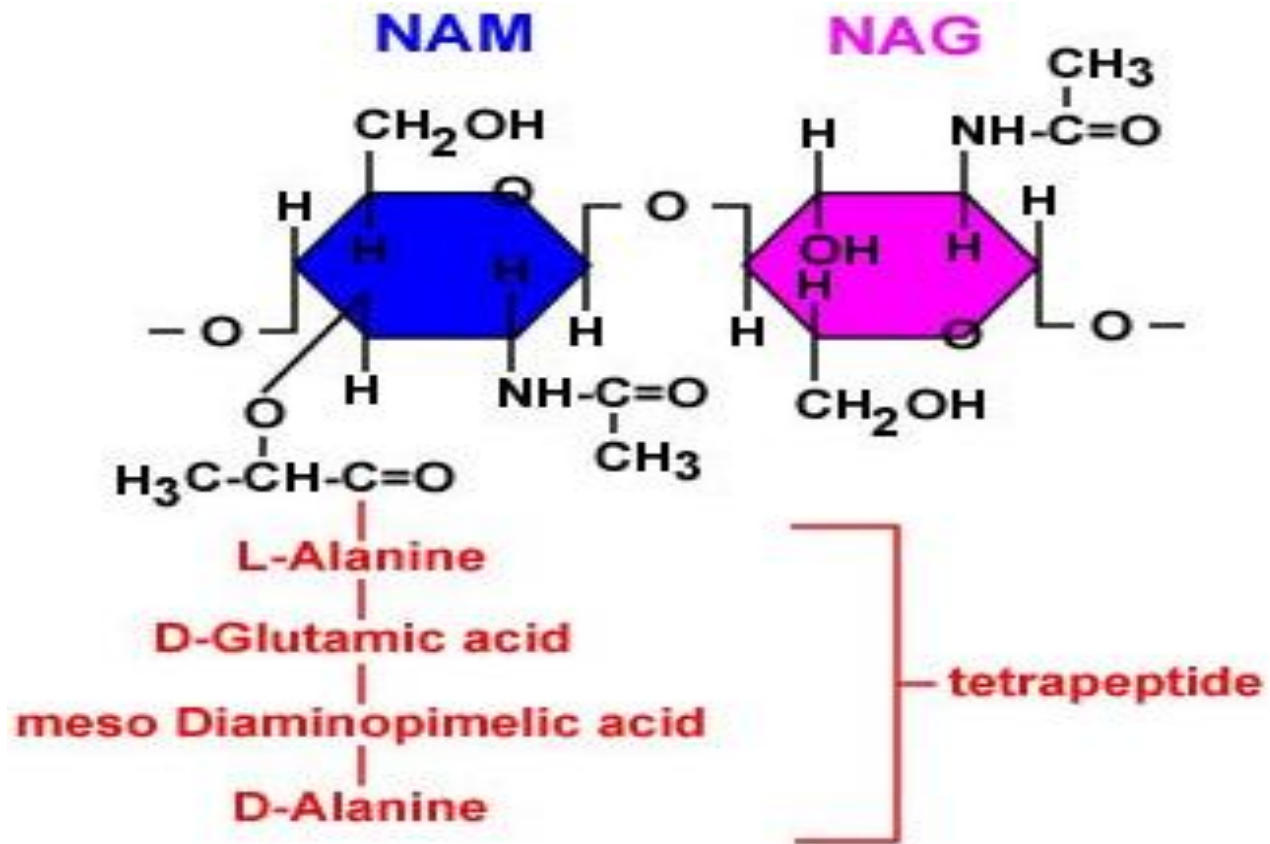
Строение пептидогликана:

- Пептидогликановый слой, состоит из пептида (протеина) и гликана (полисахарида).
- **N-ацетилглюкозамин** и **N-ацетилмурамин** соединяясь гликозидными связями образуют молекулу гликана.
- Молекулы гликана расположены параллельно и соединены между собой пептидными связями.
- **N-ацетилмурамовые** кислоты двух молекул гликана поперечно соединены между собой 4-мя аминокислотами (тетрапептидами), образуя пептидогликан.
- Количество слоев в грам-положительных бактериях достигает 40, составляя 50% массы клеточной стенки.
- Количество слоев в грам-положительных бактериях 1-2 слоя, составляя 5-10% массы клеточной стенки.

Структура пептидогликана

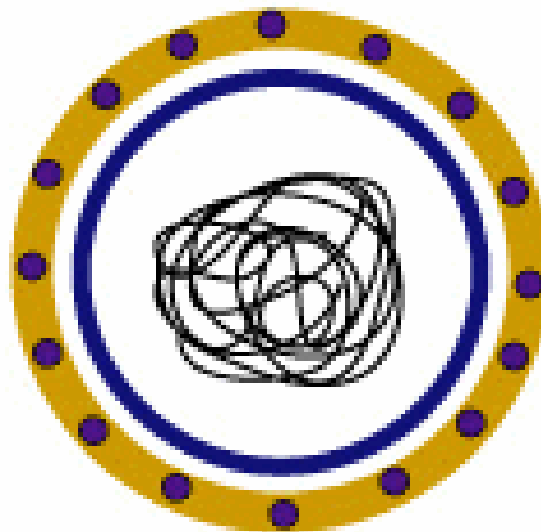


Структура пептидогликана



Биологическая активность пептидогликана

DEATH OF GRAM-POSITIVE BACTERIUM
AND RELEASE OF PEPTIDOGLYCAN AND
TEICHOIC ACIDS



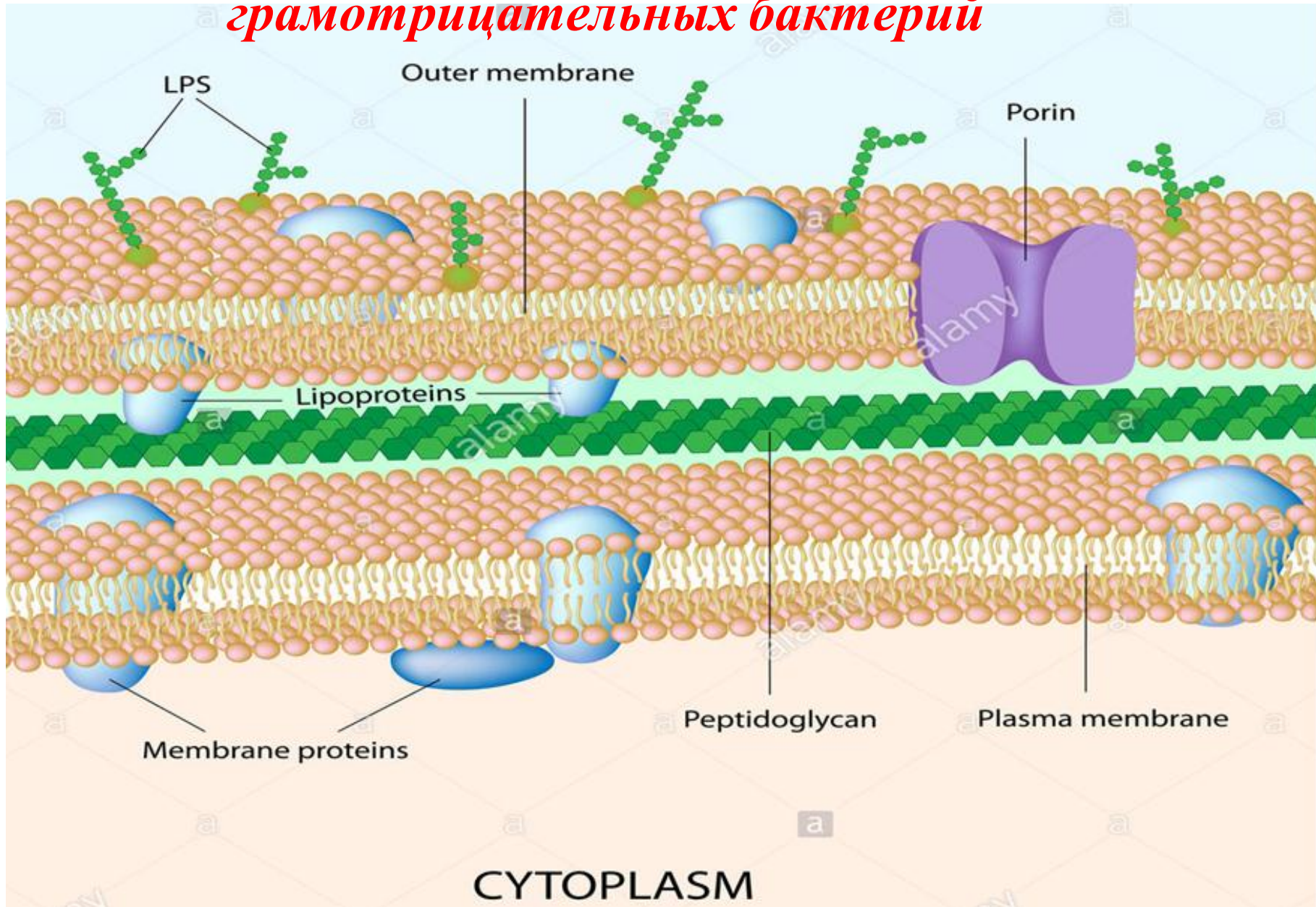
Клеточная стенка грамотрицательных бактерий

- Внешний слой клеточной стенки грам(-) бактерий составляет наружная мембрана.*
- Наружная мембрана содержит фосфолипиды и ЛПС.*
- Белки (порины) наружной мембраны снижают проницаемость клеточной стенки грамотрицательных бактерий.*
- Между наружной и цитоплазматической мембраной находится периплазматическое пространство.*
- Периплазма (составляет 20-40% клеточной стенки) содержит пептидогликан и белки.*
- В периплазматическом пространстве содержатся адаптивные ферменты и ферменты, участвующие в обменных процессах (н-р, бета-лактамаза и др).*

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий

- В состав клеточной стенки грамотрицательных бактерий входит **наружная мембрана**, связанная посредством липопroteина с подлежащим слоем пептидогликана. Она состоит из:
 - **Фосфолипидов,**
 - **Липопroteинов,**
 - **Липополисахаридов (ЛПС)**

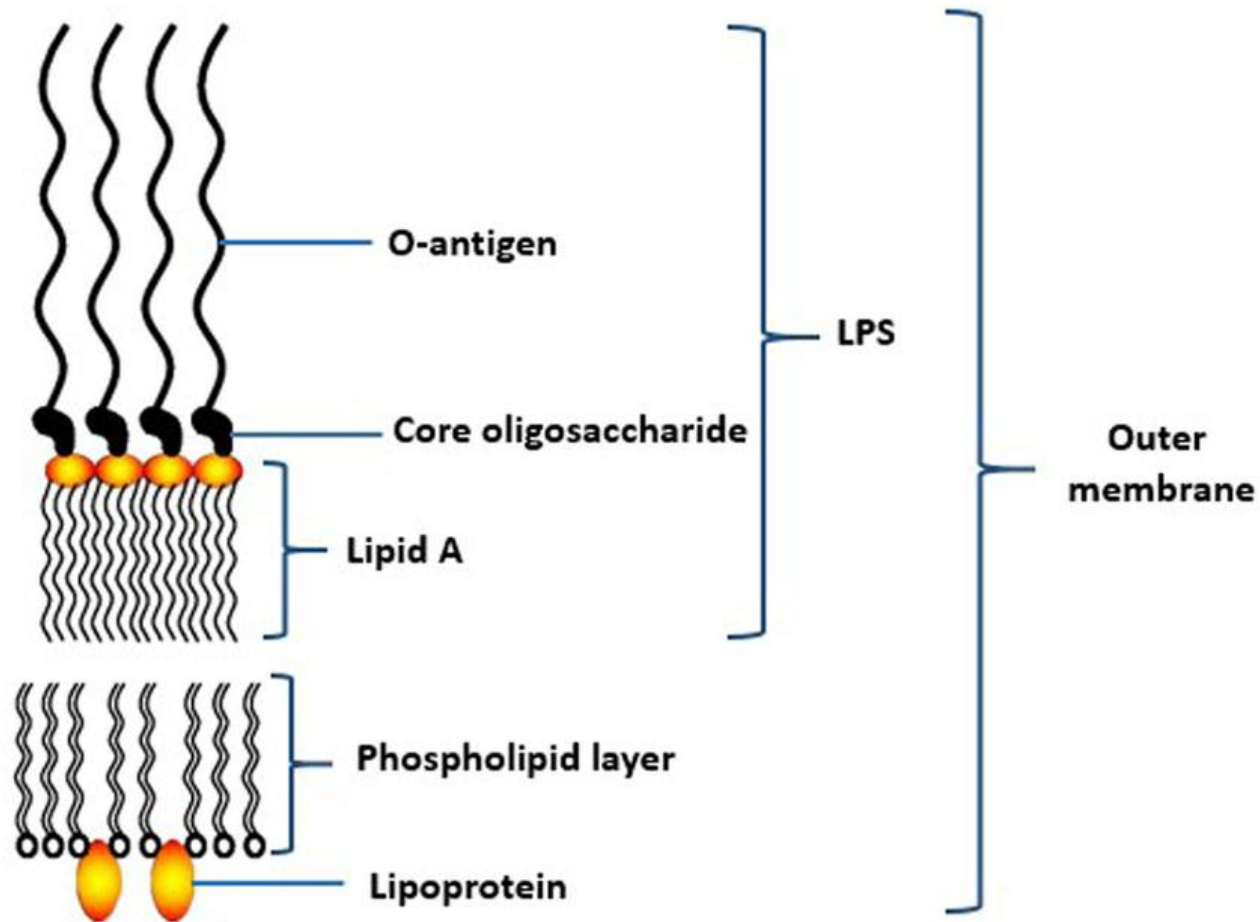
Строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий



Наружная мембрана клеточной стенки грамотрицательных бактерий

- Внутренний слой **наружной мембраны** представлен фосфолипидами, а в наружном слое расположен липополисахарид .
- Наружная мембрана грамотрицательных бактерий отличается проницаемостью от других биологических мембран.
- Благодаря содержанию липидов она характеризуется гидрофобностью.
- Молекулы белка, называемые **поринами**, окаймляют гидрофильные поры в наружной мембране, через которые путем пассивной диффузии проходят вода и мелкие гидрофильные молекулы (сахара, аминокислоты и пр.)

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий (наружная мембрана)



Клеточная стенка грамотрицательных бактерий (липополисахарид- ЛПС)

- ЛПС наружной мембраны состоит из трех фрагментов:
- **липида А** — консервативной структуры, практически одинаковой у грамотрицательных бактерий; ЛПС «заякорен» в наружной мембране липидом А
- **ядра**, или стержневой, коровой части (от лат. *core* — ядро), относительно консервативного олигосахарида;
- высоковариабельной **О-специфической цепи** полисахарида, образованной повторяющимися идентичными олигосахаридными последовательностями. О-специфическая цепь обуславливает серогруппу, серовар бактерий (**О-антиген**)
- Таким образом полисахаридная часть обуславливает **антигенность**, липидная часть - обуславливает **токсичность** ЛПС

Отличия клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий

- *Грамположительные бактерии имеют более толстую клеточную стенку толщиной 50 нм и более, 40-80% ее составляет пептидогликан.*
- *Грамотрицательные бактерии имеют более тонкую клеточную стенку, толщиной 15-20 нм, пептидогликан составляет 5-10% массы клеточной стенки*

Схема строения клеточной стенки грамотрицательных бактерий

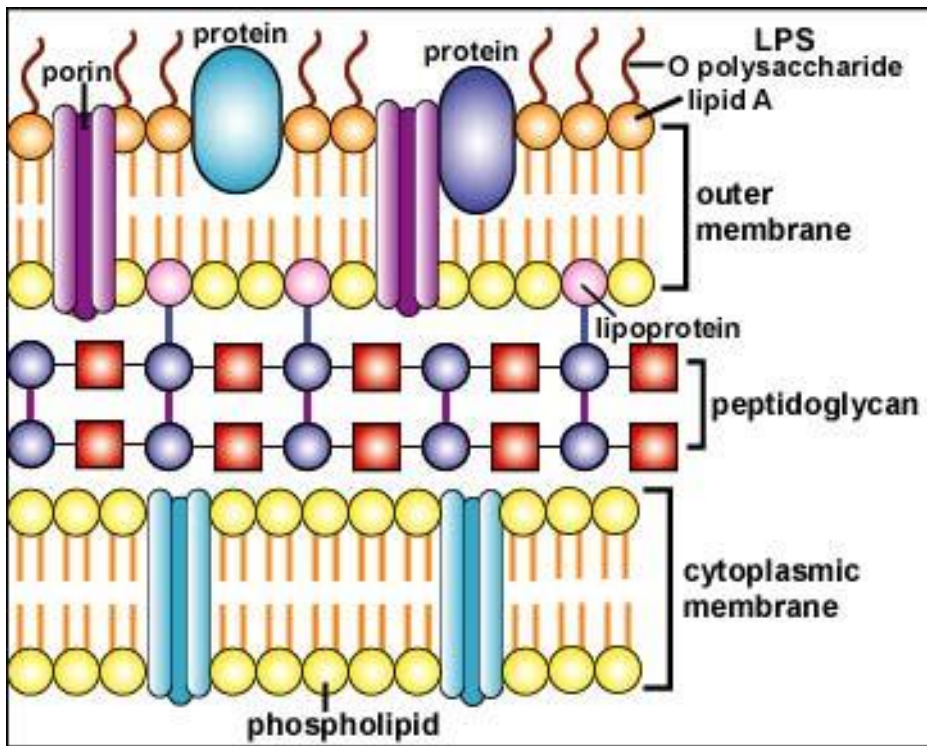
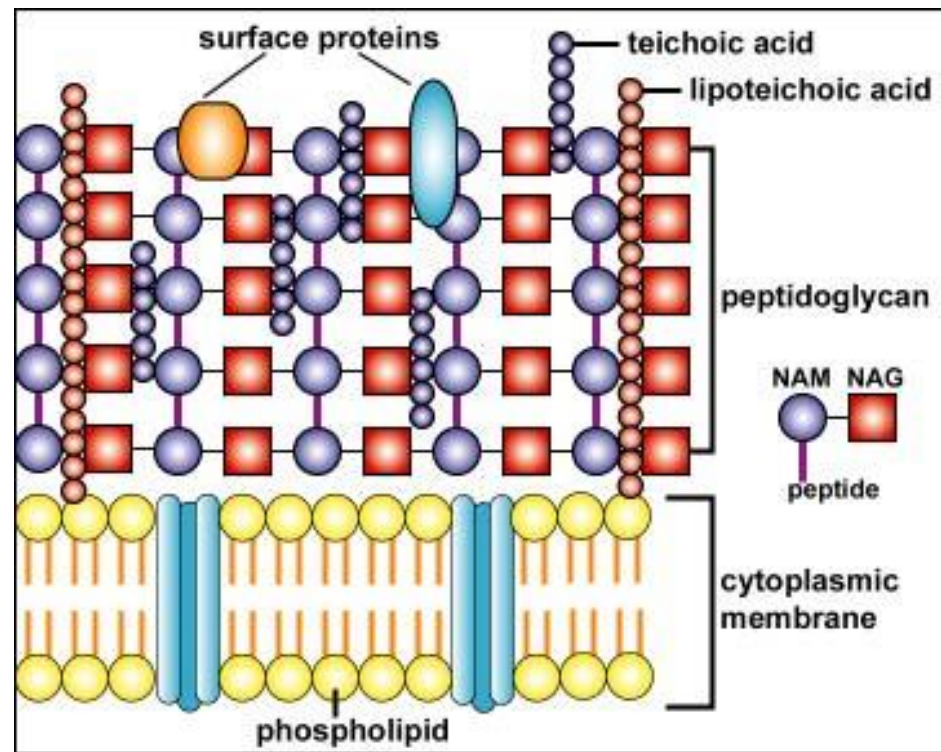


Схема строения клеточной стенки грамположительных бактерий



Отличия клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий

<i>Особенности</i>	<i>Грам+</i>	<i>Грам-</i>
<i>Толщина</i>	<i>20-80 нм</i>	<i>10 нм</i>
<i>Содержание пептидогликана</i>	<i>>50%</i>	<i>10 -20 %</i>
<i>Тейхоевые кислоты</i>	<i>+</i>	<i>-</i>
<i>Липиды и липопротеины</i>	<i>0-3%</i>	<i>58%</i>
<i>Белки</i>	<i>0%</i>	<i>9%</i>
<i>Липополисахарид</i>	<i>0%</i>	<i>13%</i>
<i>Чувствительность к пенициллину</i>	<i>+</i>	<i>-</i>
<i>Чувствительность к лизоциму</i>	<i>+</i>	<i>-</i>

Утрата клеточной стенки

Грам(+)

протопласты

*Не
размножаются*

Грам(-)

сферопласты

*Не
размножаются;
способны к
реверсии*

*Грам(-)и
Грам(+)*

*L- формы -
размножаются*

*Стабильные
– не могут
возвращаться
в исходную
форму*

*Нестабильные –
способны к
реверсии*

- *Латентная инфекция*
- *Развитие антибиотикорезистентности*

Техника окраски по методу Грама

1. На фиксированный мазок помещают полоску фильтровальной бумаги и добавляют раствор **генцианового фиолетового** на 2-3 мин

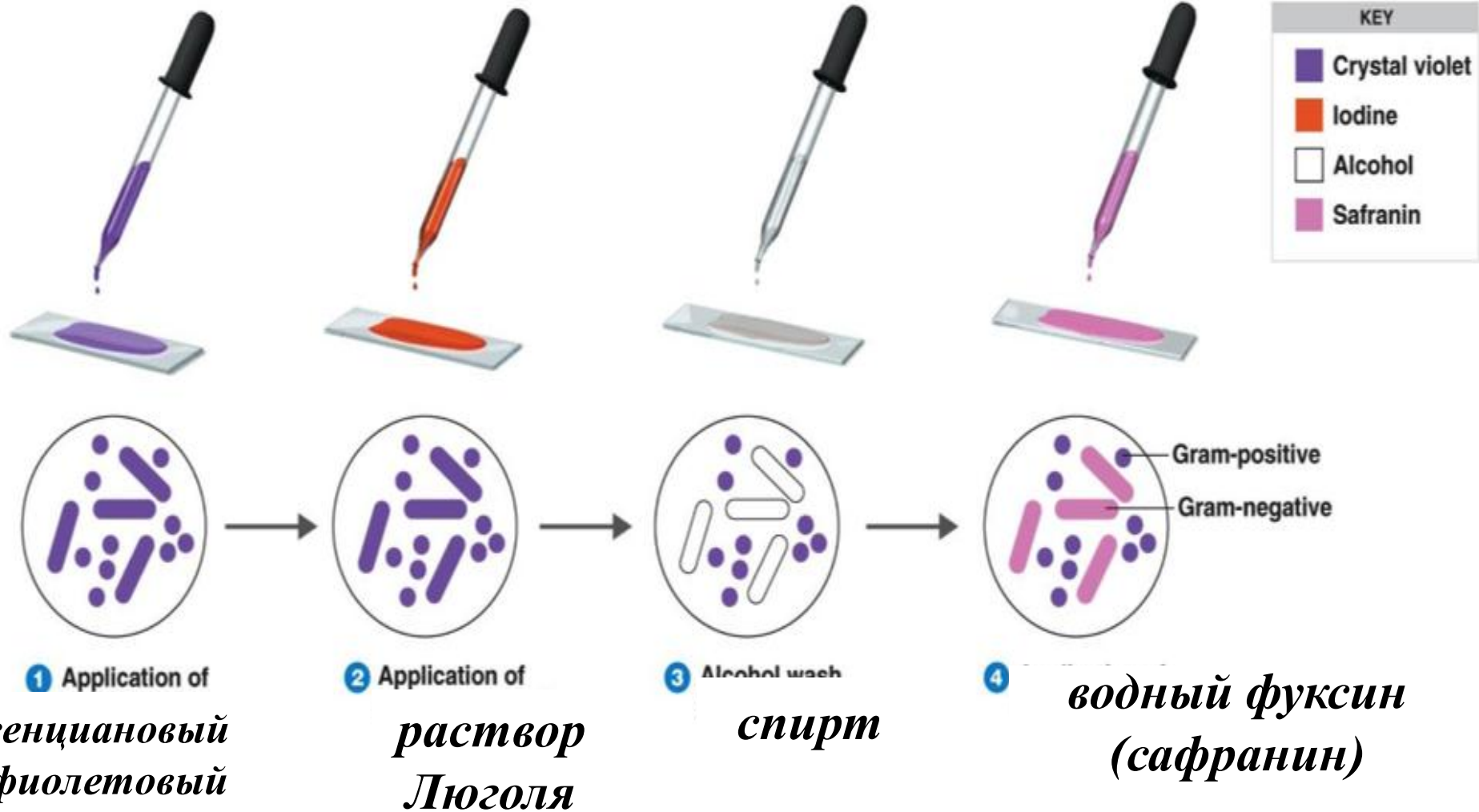
2. Бумагу снимают и наносят **раствор Люголя** на 1 мин

3. Сливают раствор Люголя, обесцвечивают мазок 96% спиртом в течение 30-40 сек

4. Мазок промывают водой, наносят **водный фуксин** на 1-2 мин. Промывают еще раз, высушивают и микроскопируют.

Грам (-) бактерии окрашиваются **в красный**,
грам(+) - **в темно-фиолетовый цвет**

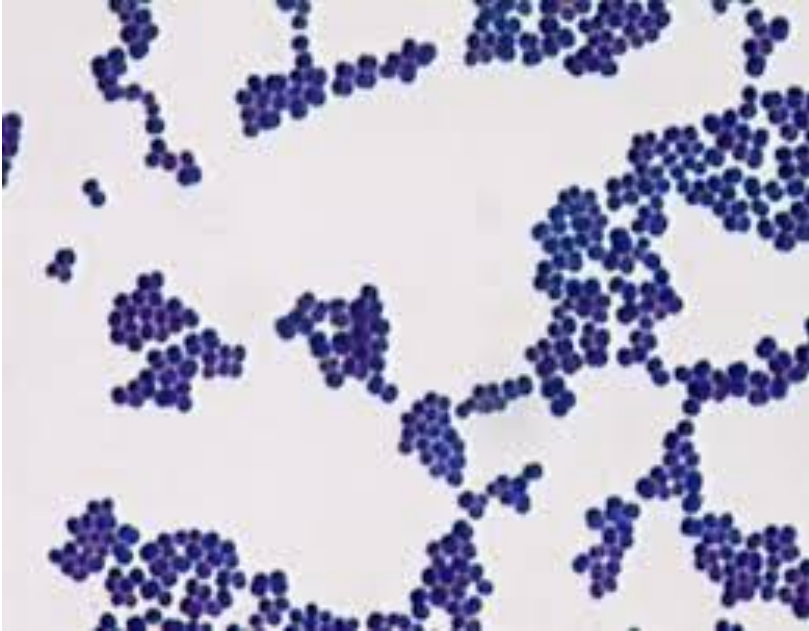
Техника окраски по методу Грама



Техника окраски по методу Грама



Метод Грама



*Грамположительные
(S.aureus)*

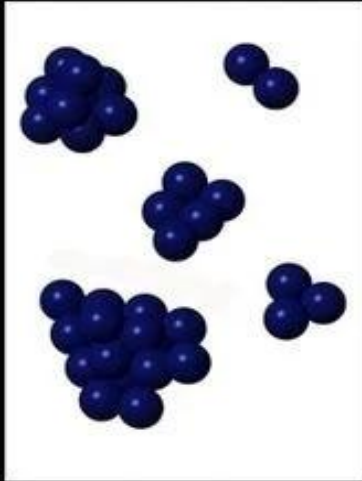


*Грамотрицательные
(E.coli)*

Грам положительные и Грам отрицательные бактерии

www.bacteriainphotos.com

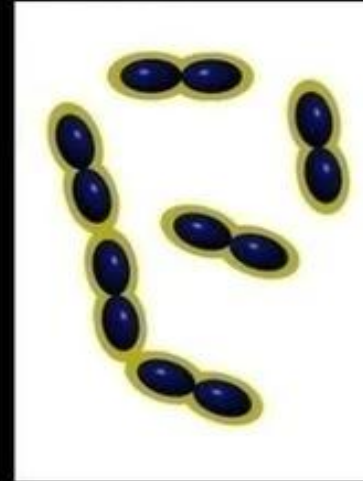
GRAM - POSITIVE



Staphylococcus aureus



Streptococcus agalactiae

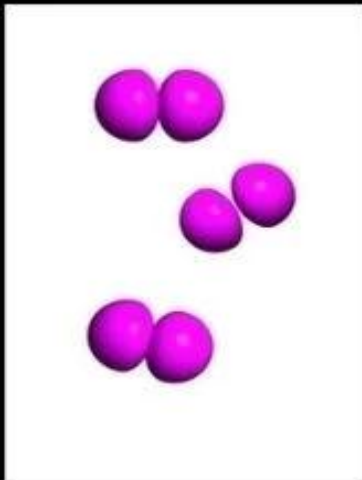


Streptococcus pneumoniae



Listeria monocytogenes

GRAM - NEGATIVE



Neisseria meningitidis



Haemophilus influenzae



Klebsiella pneumoniae



Escherichia coli

Плохо окрашиваются по методу Грама

- *Mycobacterium* (связано с содержанием большого количества липидов в клеточной стенке)
- *Rickettsia* *ve Chlamydia* (очень мелкие по размерам, облигатные внутриклеточные паразиты)
- *Legionella pneumophila* (плохо воспринимают раствор фуксина)
- *Mollicutes* (в связи с отсутствием клеточной стенки- род *Mycoplasma*)
- *Treponema pallidum* (слабо воспринимают красители)