**Занятие 2**

Ультраструктура бактериальной клетки, строение клеточной стенки. Метод Грама. Кислотоустойчивые бактерии, их окраска по Цилю-Нильсену. Споры, их обнаружение методом Ожешко. Внутриклеточные включения. Выявление гранул волютина методом Нейссера. Жгутики и капсула. Методы изучения подвижности микробов (препараты «раздавленная» и «висячая» капля, витальный метод). Негативный метод Бурри. Выявление капсулы по методу Гинс-Бурри.

**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 мкмŞ толщина- 0,1- 2,5 мкм

* 1 mkm = 10-6 m = 10-3 mm
* 1 nm = 10-9 m = 10-6 mm
* 1000 nm = 1 mkm
* 0.001 mkm = 1 nm

**Кокки:**

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

**Палочковидные бактерии:**

* Палочковидные бактерии или палочки имеют прямоугольные формы.
* По расположению:

 - одиночное хаотичное – кишечная палочка

 - парами (диплобациллы) - klebsiella

 - цепочки(стрептобациллы) – возбудитель сибирской язвы

* Концы палочковидных бактерий:

 - круглые

 - обрубленные

 - изогнутые (фузобактерии)

* Палочковидные бактерии:

 - бацидды (спорообразующие аэробные палочковидные бактерии)

 - клостридии (неспорообразующие анаэробные палочковидные бактерии)

**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 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.

-Тонкий“ мазок крови– на одну сторону обезжиренного предметного стекла наносят 1 каплю крови, затем распреде- ляют вторым стеклом под углом 45°. Позволяет определить вид возбудителя.

* Бактериологическая петля, которую держат в правой руке, раскаляют в пламени.
* На обезжиренное предметное стекло наносится 1 капля физиологического раствора.
* 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.
* При помощи Петли берется материал из пробирки.
* Пробирку с пробкой пропускают через пламя, закрывают.
* Микробную культуру на конце петли смешивают с физиологическим раствором в диаметре 1 см на поверхности покровного стекла.
* Бактериологическая петля стерилизуется в пламени

**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)

* Мазок фиксируют на предметное стекло, чтобы он не удалился при смывании и окрашивании.
* Для обезвреживания микробов. Кроме того, убитые микробы окрашиваются лучше, чем живые.
* 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

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

**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.

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

**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.
* Обусловливает 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 окружающий 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 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-отрицательных бактериях 1-2 слоя, составляя 5-10% массы клеточной стенки.

**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-лактмаза и др).В состав клеточной стенки грамотрицательных бактерий входит наружная мембрана, связанная посредством липопротеина с подлежащим слоем пептидогликана. Она состоит из:

* Фосфолипидов,
* Липопротеинов,
* Липополисахаридов (ЛПС)

**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.)

Отли**чия клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий**

* Грамположительные бактерии имеют более толстую клеточную стенку толщиной 50нм 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
* Отличия клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий

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

**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 1мин

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

**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 pneumoniae (плохо воспринимают раствор фуксина)
* Mollicutes (в связи с отсутствием клеточной стенки- род Mycoplasma)
* Treponema pallidum (слабо воспринимают красители)

**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.

**Жгутик- орган подвижности, состоящий из белка флагеллина:**

* Обусловливает подвижность палочковидных и спиралевидных бактерий
* Прикрепляется к цитоплазматической мембране базальным тельцем
* Базальное тельце содержит стержень со специальными дисками - одна пара дисков у грам(+), и две пары у грам (-) бактерий
* Флагеллин является антигеном (Н-антиген), субъединицы флагеллина закручены в виде спирали
* В движении спирохет участвуют фибриллы, прикрепленные к концам клетки и направленные навстречу друг другу (эндофлагеллы)

**По расположению жгутиков различают**

|  |  |
| --- | --- |
| ***Атрих***  | ***Shigella, Klebsiella, Acinetobacter***  |
| ***Монотрих***  | ***Campylobacter, V.cholera, Pseudomonas*** |
| ***Лофотрих***  | ***Helicobacter*** |
| ***Амфитрих*** | ***Spirillum*** |
| ***Перитрих***  |  ***E.coli, Proteus, Salmonella***  |

**Пили (фимбрии, микроворсинки):**

* Состоят из белка пилина
* Отходят от цитоплазматической мембраны
* Прикрепление к субстрату
* Питание
* Участие в водно-солевом обмене
* Половые пили (F-фертильность)
* Передача генетического материала при конъюгации
* кодируются F-плазмидой

**Изучение подвижности бактери.**

***Прямой метод***→ ***“феномен роения”***

* Метод Шукевича - применяется для получения чистой культуры протея и других микроорганизмов обладающих «ползущим» ростом.
* Препараты “раздавленная и висячая” капля
* Витальная окраска
* Метод Леффлёра –протравливание смесью растворов фуксина, танина и раствора сернокислого Fe и докрашивание карболовым фуксином

**Приготовление препарата «висячая капля»**

* Препарат «раздавленная» капля готовят для изучения подвижности
* На середину предметного стекла наносят каплю исследуемого материала и накрывают покровным стеклом
* Приготовленные препараты рассматривают в затемненном поле зрения светового микроскопа

**Препарат «висячая» капля**

* ***1-2.*** Небольшую каплю исследуемого материала наносят на покровное стекло
* 3. Предметным стеклом с лункой покрывают покровное стекло и быстро переворачивают препарат покровным стеклом вверх. В этом случае капля свободно свисает не касаясь дна и краев лунки

**Витальная окраска**

* Витальное окрашивание используется для изучения живых бактерий.
* Размножение микроорганизмов
* Спорообразование
* Влияние физических и химических факторов
* Используют 10000, 100000-ые разведения растворов метиленового синего и нейтрального красного

**Капсула**

* Слизистая структура, прочно связанная с клеточной стенкой бактерий.
* Защищает от воздействия факторов внешней среды
* Образуемая в организме людей и животных капсула, препятствует действию защитных факторов
* Участвует в адгезии микробов
* Капсула обладает антигенностью, в организме образуются антитела к капсуле
* “K”-антиген используется при идентификации капсульных бактерий
* Мукоидные экзополисахариды, не имеющие четких внешних границ образуют слизь
* Экзополисахариды, участвующие в адгезии бактерий называют гликокаликсом

**Химический состав капсулы**

* Полисахариды – Streptococcus pneumoniae, Klebsiella
* Белки - Bacillus antracis, Yersinia pestis
* Гиалуроновая кислота- Streptococcus pyogenes

**Бактерии, образующие капсулу**

* *S.aureus, S. pyogenes, S.pneumoniae, B.anthracis, C.perfringens* образуют капсулу только в макроорганизме
* Образуют капсулу в макроорганизме и на питательных средах - бактерии рода *Klebsiella*

**Выявление капсулы по методу Бурри-Гинса**

* На предметное стекло наносят каплю черной туши с которой смешивают культуру бактерий, и затем распределяют при помощи второго предметного стекла, которое держат под углом 45°.
* Мазок высушивают и фиксируют физико-химическим методом
* Наносят карболовый фуксин Циля на 3-5 мин, промывают и микроскопируют
* В препарате видны бактерии красного цвета, вокруг которых контрастно выделяются неокрашенные капсулы на черном фоне