**Занятие 2**

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

**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.

**Простой метод окраски.** Методы окраски подразделяются на простые и сложные**.** При простом методе окраски используется всего один краситель.

- фуксин Пфейффера (водный фукцин) - 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

**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)