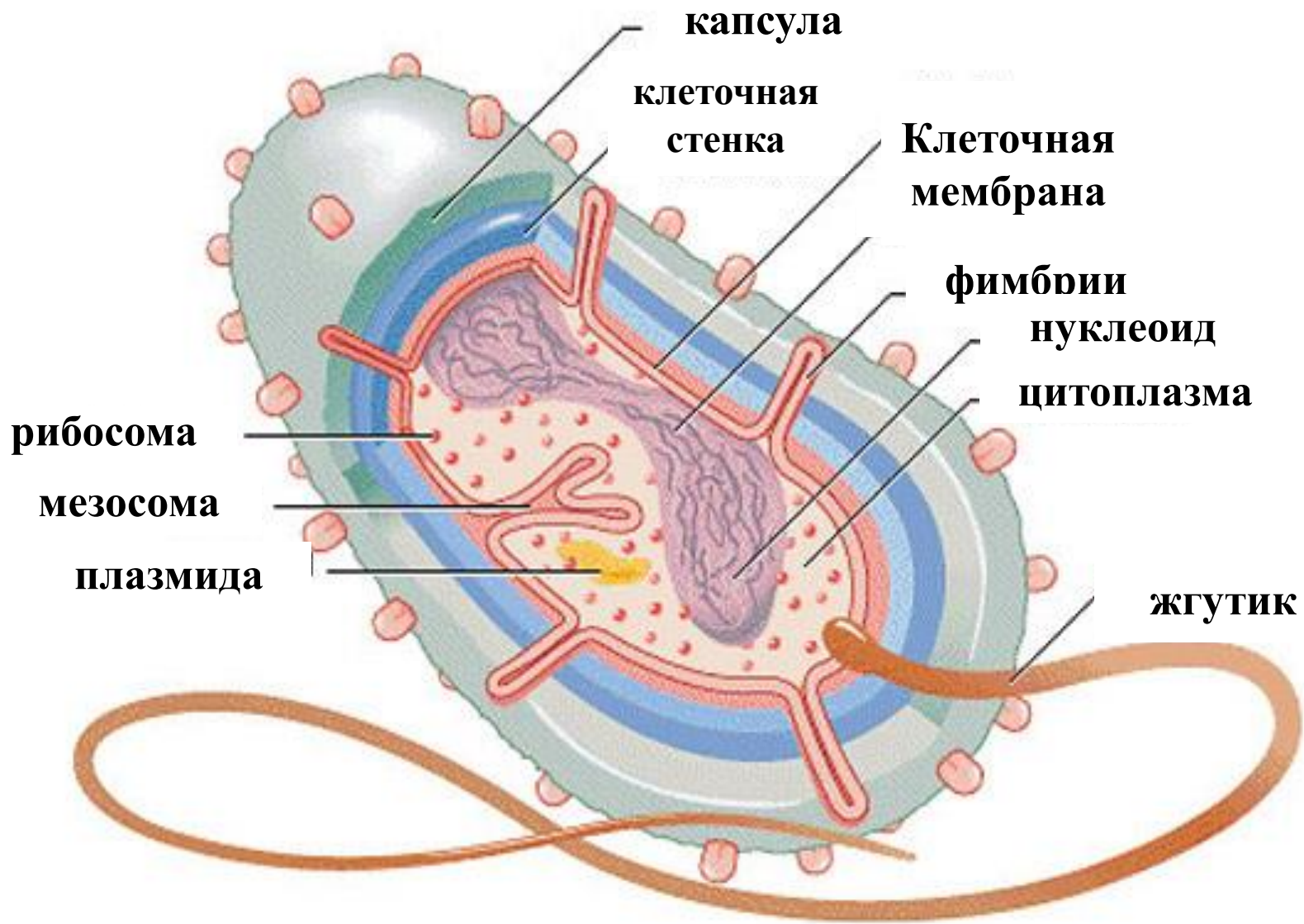


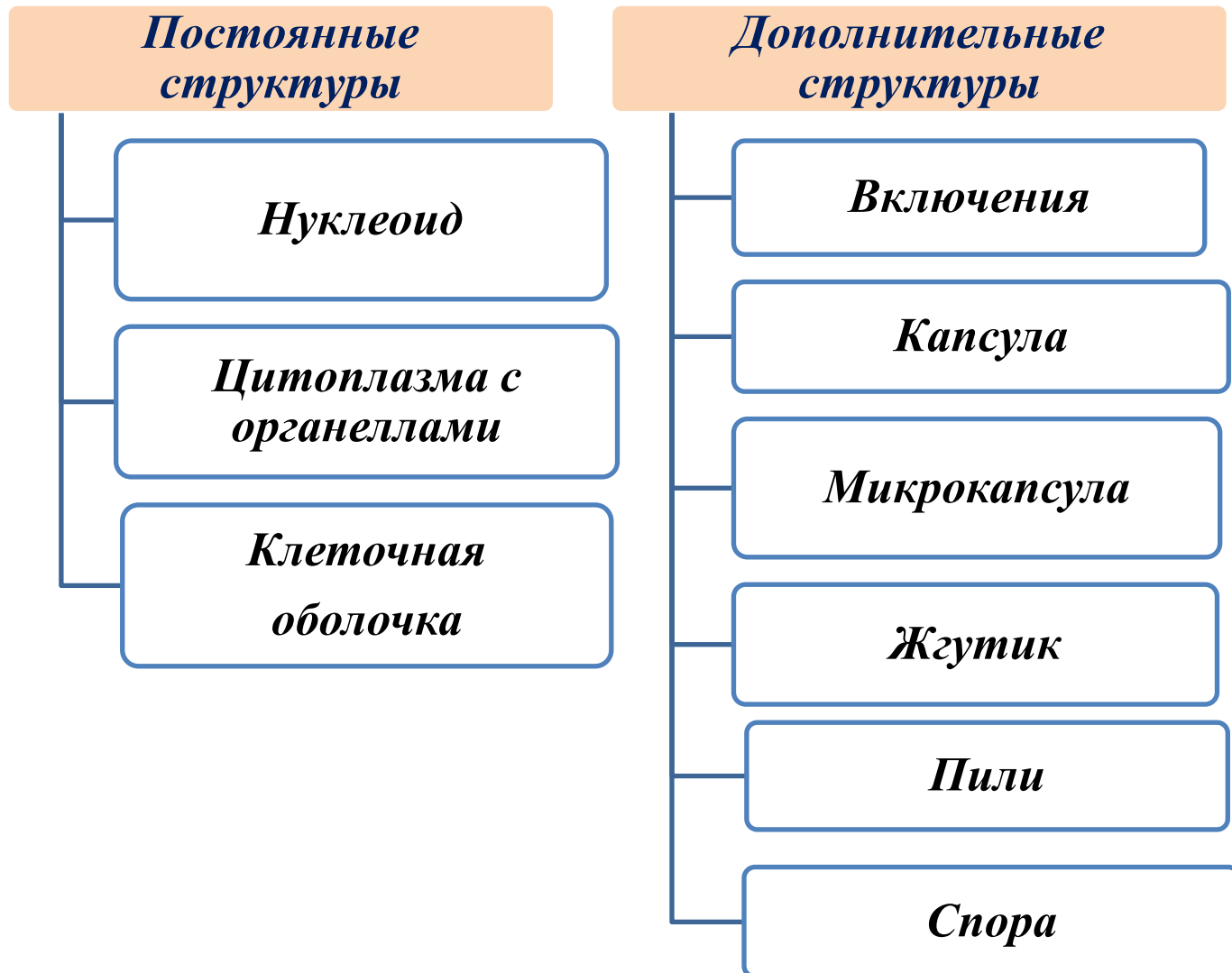
Тема 2

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

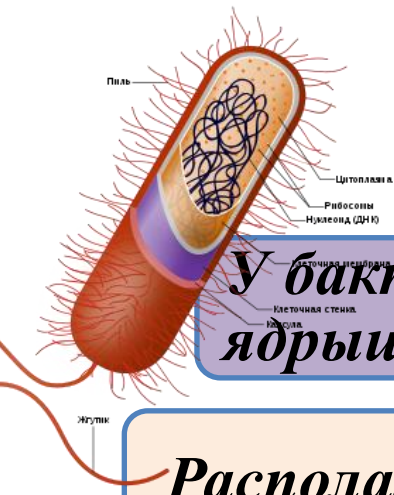
Строение бактериальной клетки



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 двунитевой ДНК

*у *Borrelia burgdorferi* ДНК линейная*

Помимо хромосомы имеются вне хромосомные факторы наследственности - плазмиды

Выявляют нуклеоид по методу Фёльгена и Гимзы

Цитоплазма и внутрицитоплазматические включения

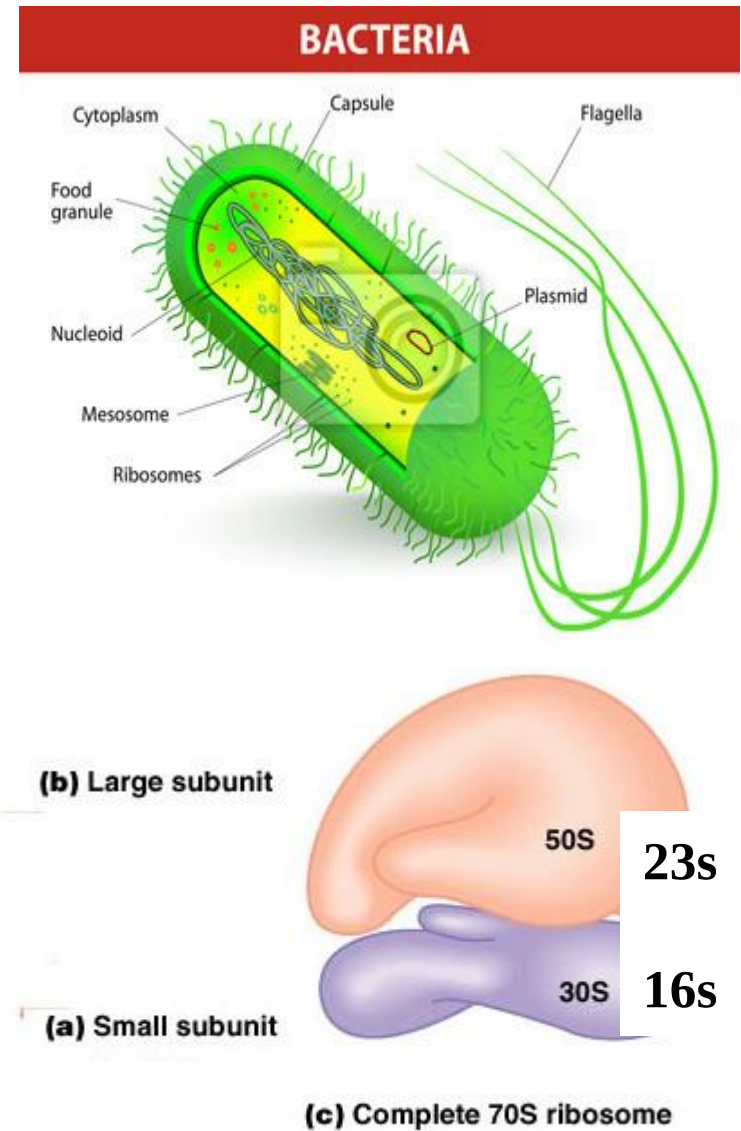
➤ **Цитоплазма** коллоидный матрикс, содержит растворимые белки, включения и рибосомы (РНК)

➤ **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

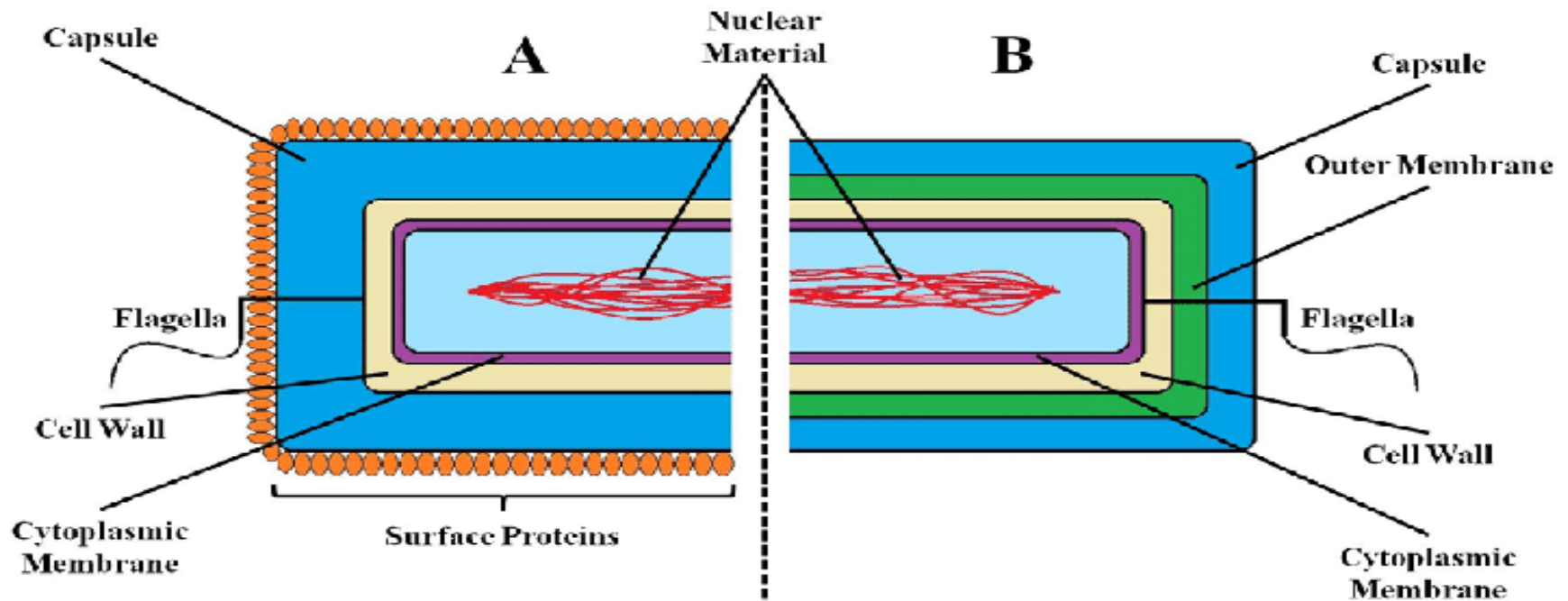
➤ В качестве запасных питательных веществ и источника энергии в цитоплазме накапливаются различные включения (гранулы гликогена, полисахариды, липиды и полифосфаты)



Оболочка бактериальной клетки

Оболочка бактериальной клетки включает:

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

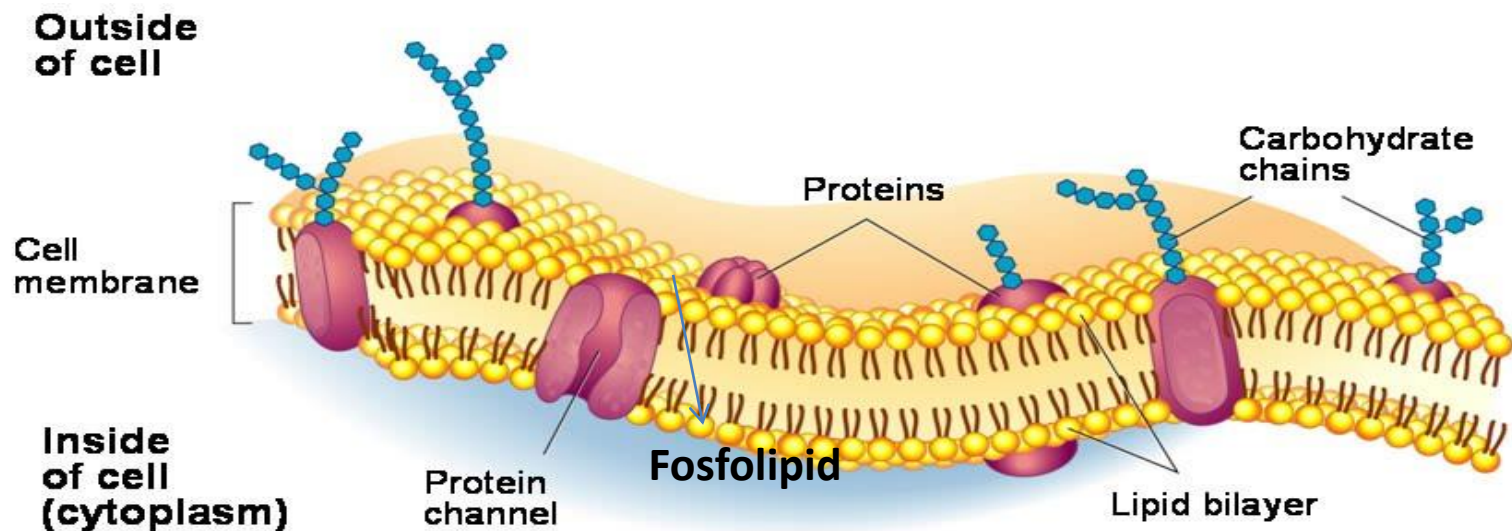


Функции цитоплазматической мембраны

- ✓ *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** → выпячивания 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***

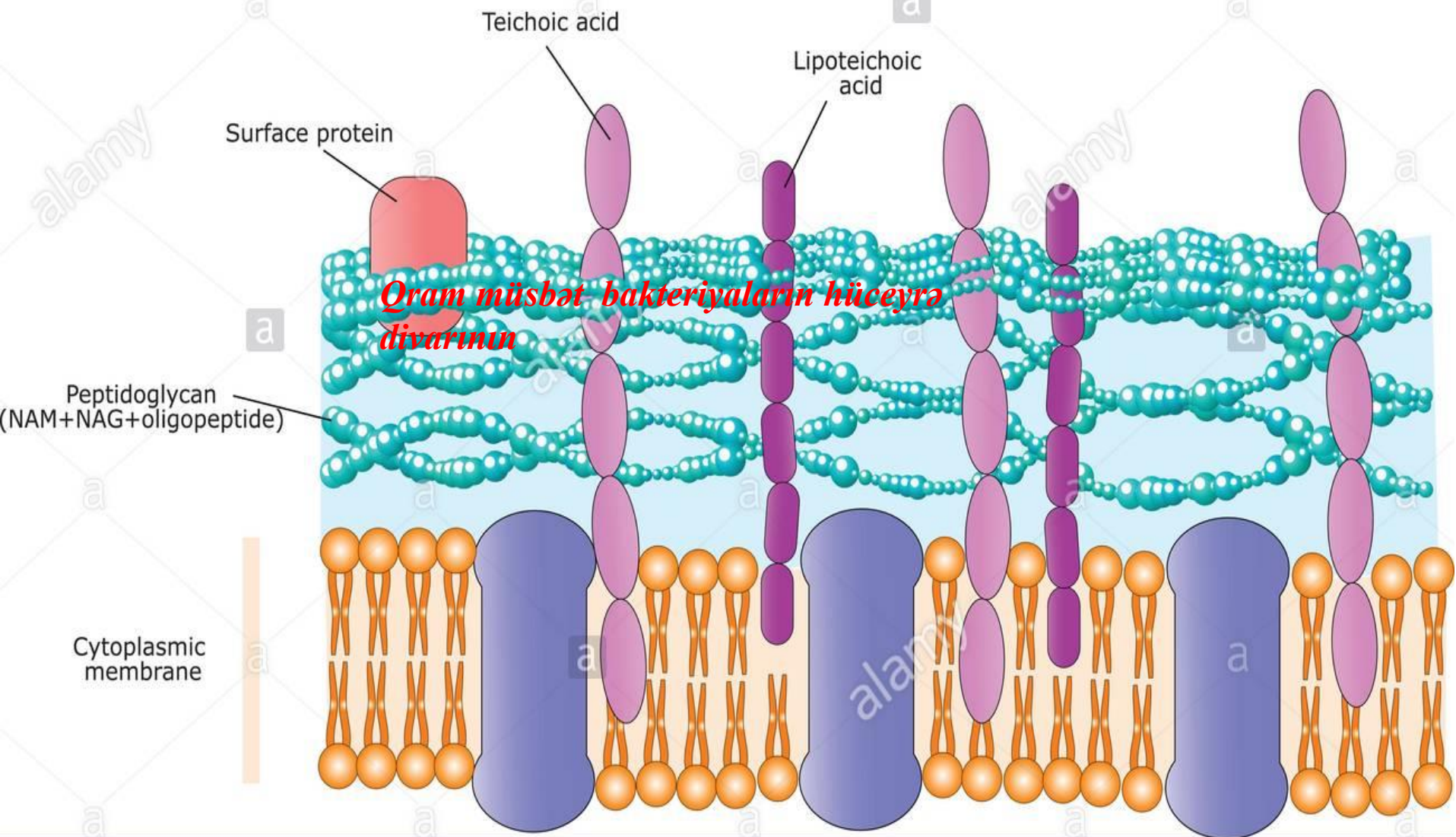
Отличия клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий

- *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

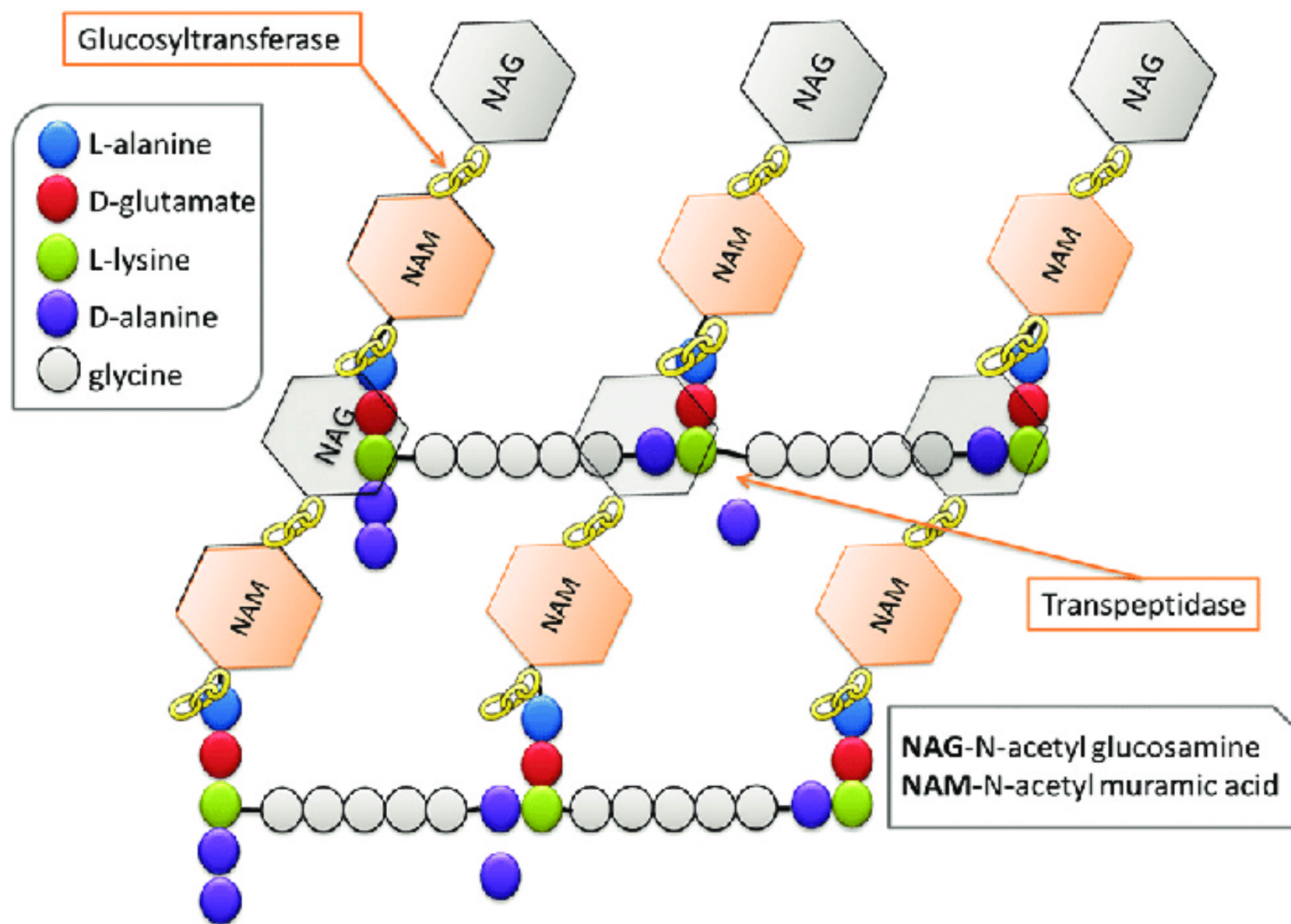
Строение клеточной стенки грамположительных бактерий

- ✓ *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.*

Клеточная стенка грамположительных бактерий



Структура пептидогликана



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).*

Липополисахарид (LPS)

Липид А -гликолипид

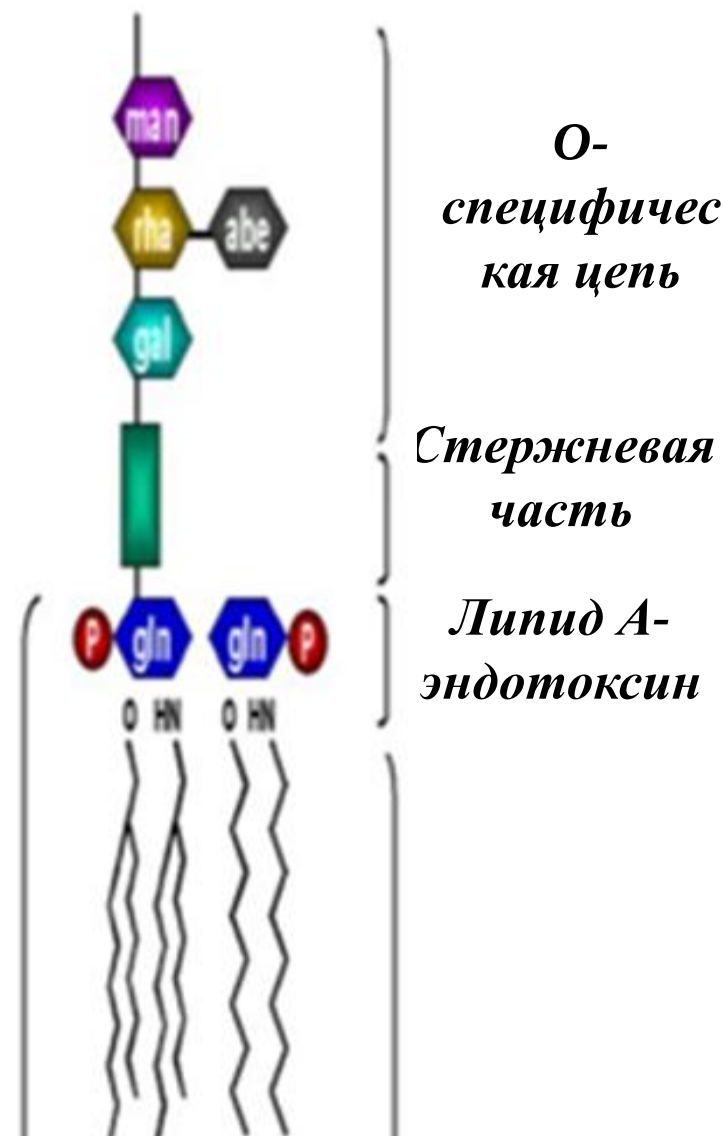
- Длинноцепочечные жирные кислоты + дисахарид глюкозамин
- Обуславливает токсичность (эндотоксин)

Ядро – кетодезоксиоктоновая кислота, гептоза.

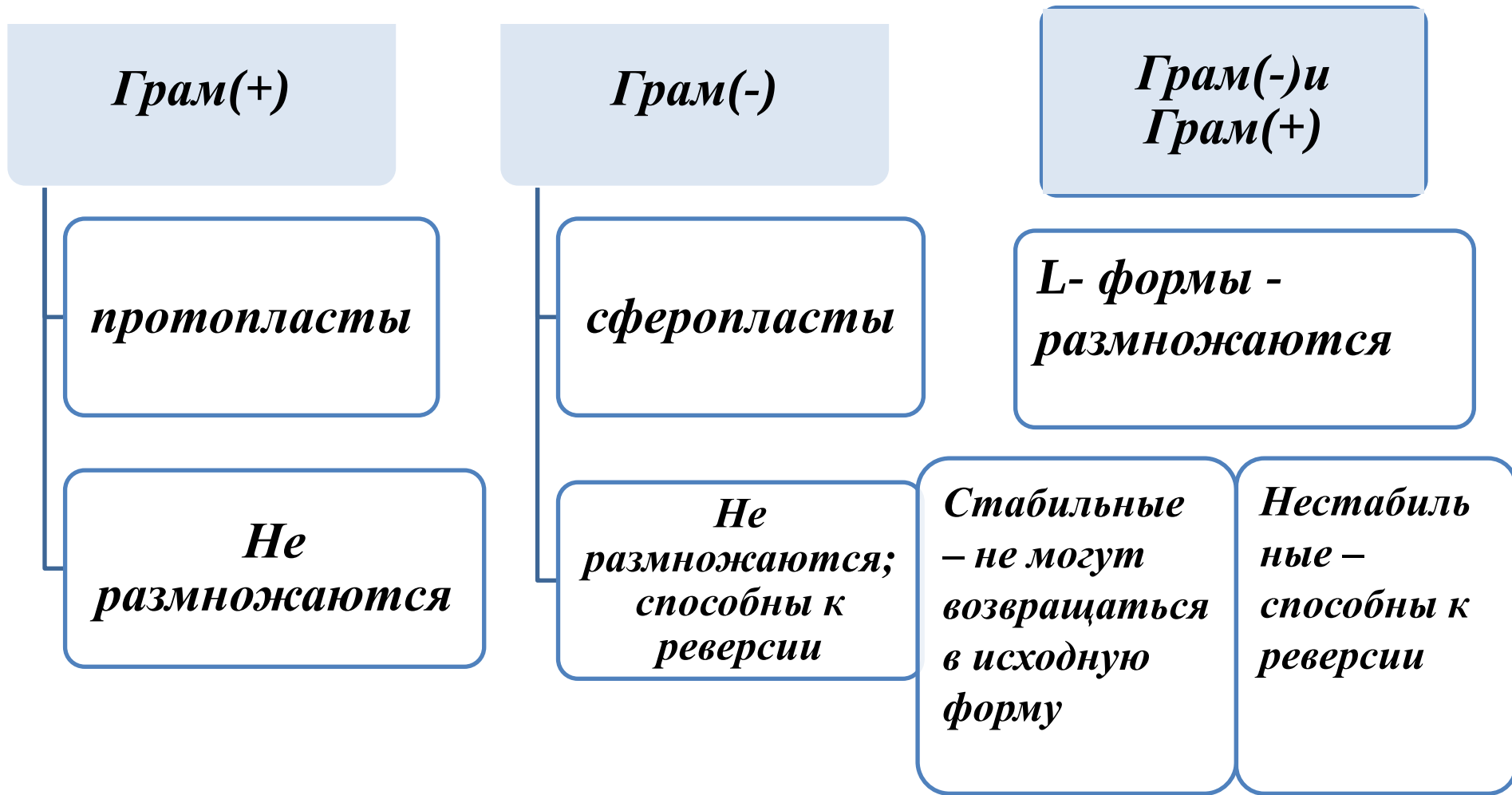
полисахарид, общий у всех грам(-) бактерий

О-специфическая полисахаридная часть

- Повторяющиеся полисахаридные последовательности (три-, тетра-, пента-)
- Обуславливает серогруппу



Утрата клеточной стенки



- *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

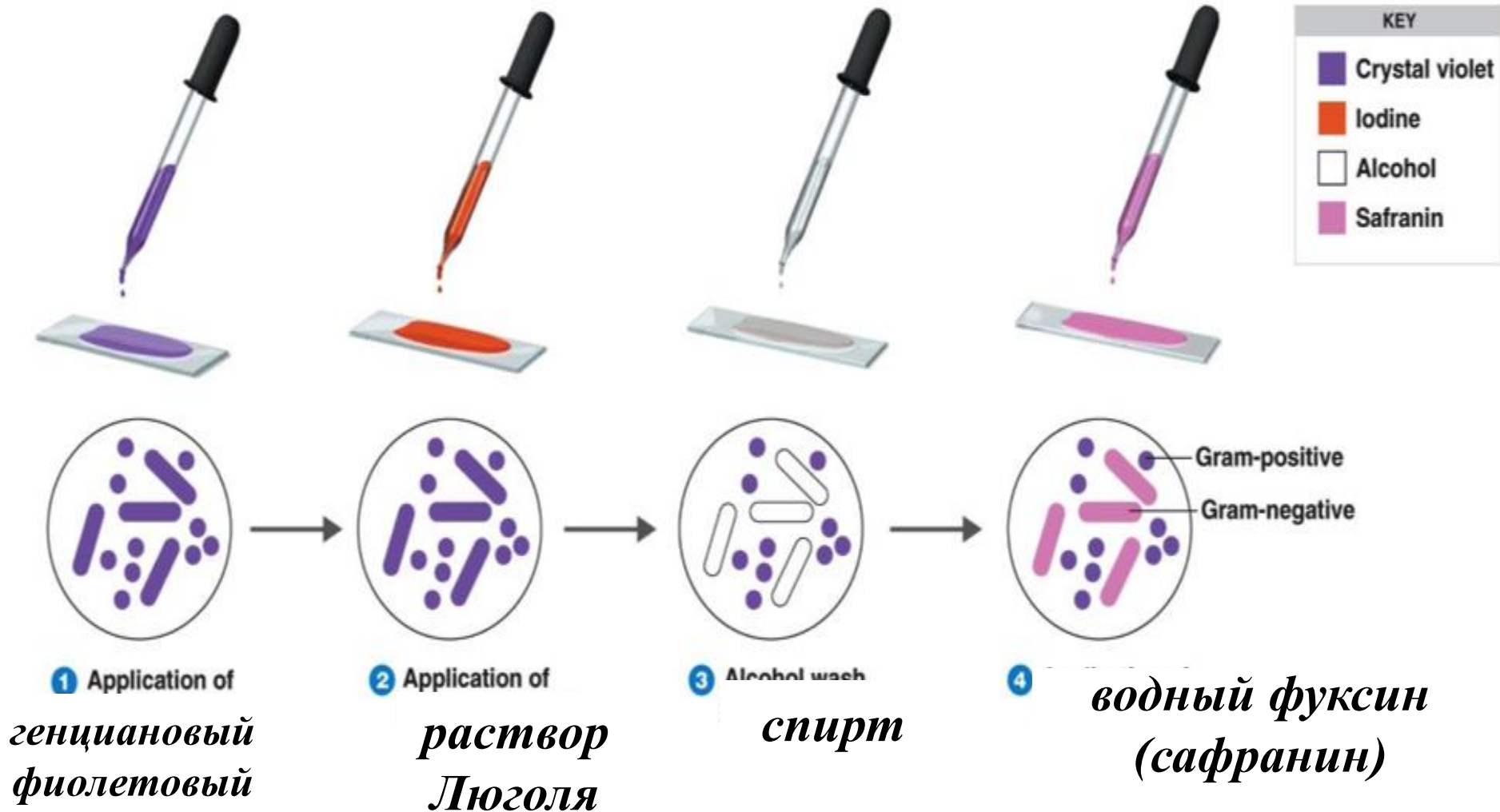
2. Бумагу снимают и наносят **раствор Люголя** на 1 мин

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



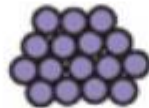
Метод Грама

Gram-Positive
Staphylococcus aureus

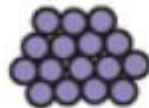
Kristal moru
(Kristal viyole)



Lugol eriyiği
(mordan olarak)



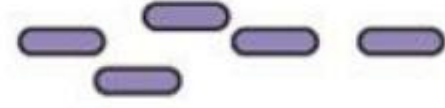
Alkol
(%96'lık etil alkol)



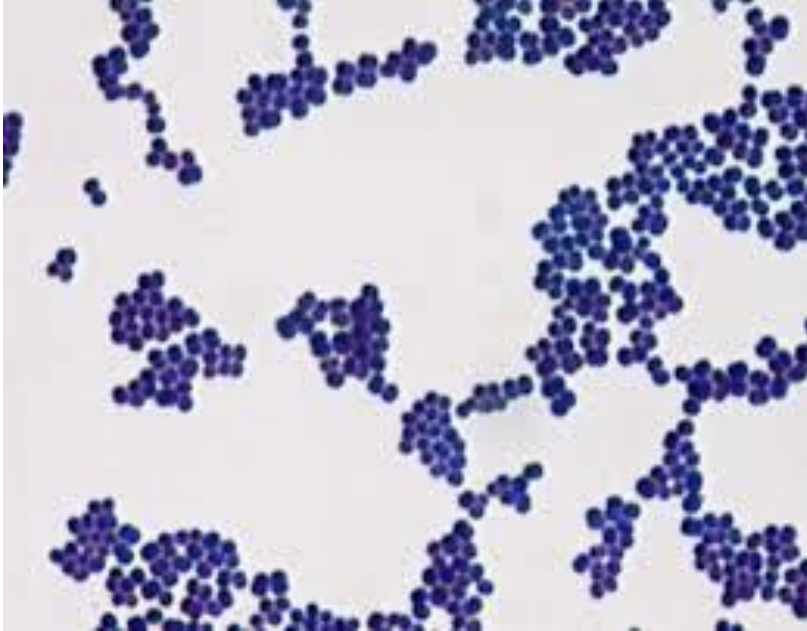
Safranin



Gram-Negative
Escherichia coli



Метод Грама



*Грамположительные
(S.aureus)*



*Грамотрицательные
(E.coli)*

Не 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:

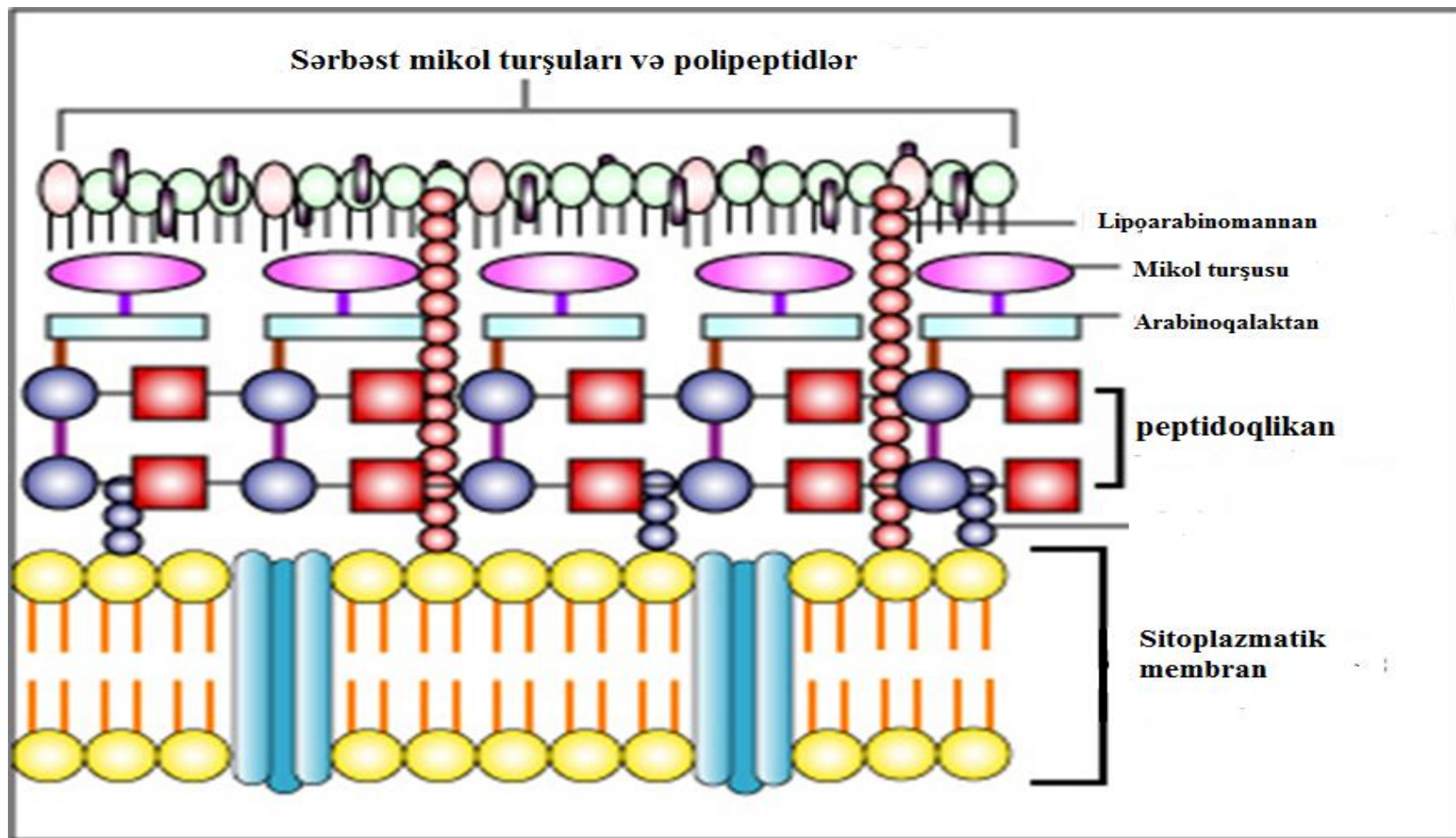
- *Липидов*
- *Миколовых кислот (восковидные субстанции и пр.)*
- *Оксикислот и пр.*

✓ ***Mycobacterium tuberculosis*** (возбудитель туберкулеза)

✓ ***M.leprae*** (возбудитель лепры)

✓ *некоторые представители рода **Actinomyces***

Строение клеточной стенки кислотоустойчивых бактерий



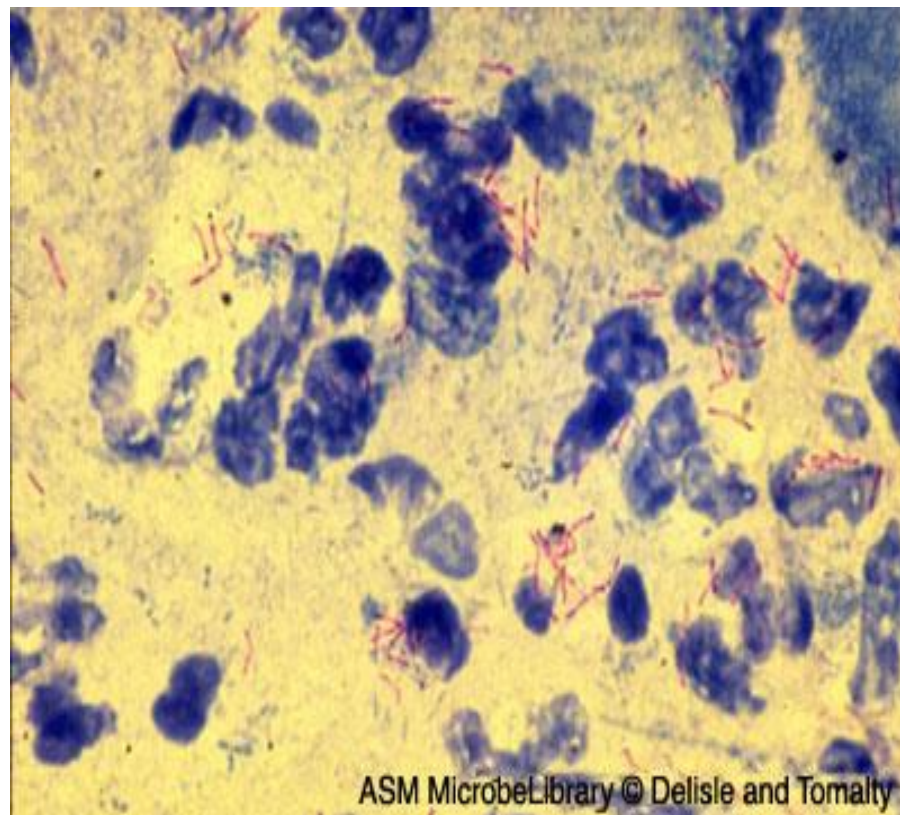
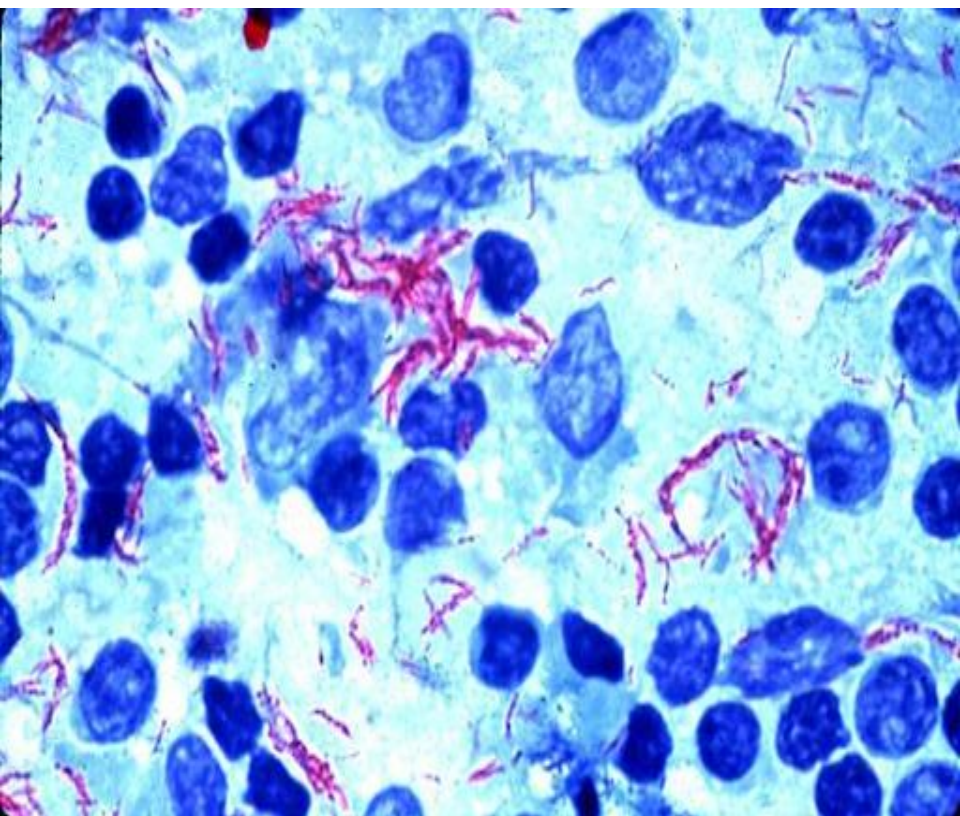
Методика окраски по методу Циля-Нильсена

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

Кислотоустойчивые бактерии



*Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в **красный** цвет*

*Некислотоустойчивые - в **синий** цвет*

Зерна волютина

➤ Гранулы полифосфатов – метакроматические включения (зерна **Бабеша-Эрнста**) выявлены у коринебактерий (*Corynebacterium diphtheria*, *Gardnerella vaginalis* и пр.), играют роль при дифференциации этих бактерий.

➤ Обнаруживаются по **методу Нейссера**.

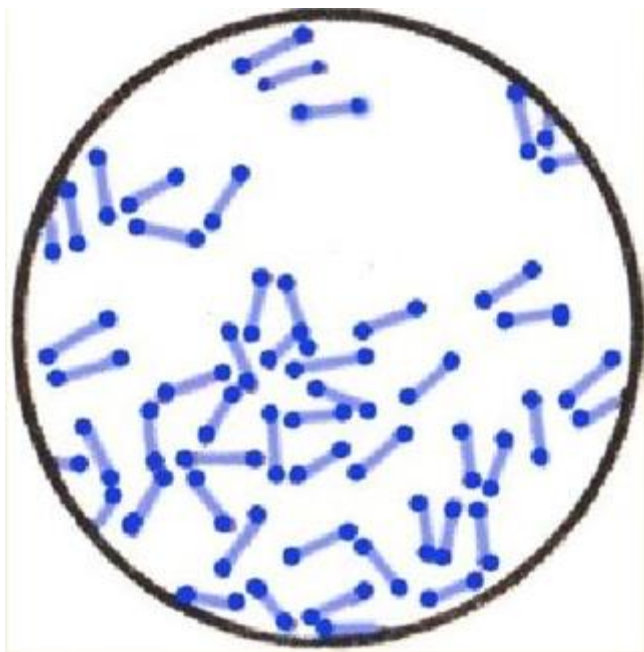
➤ При электронной микроскопии имеют вид электронно-плотных гранул размером 0,1-1,0 мкм

Corynebacterium diphtheria

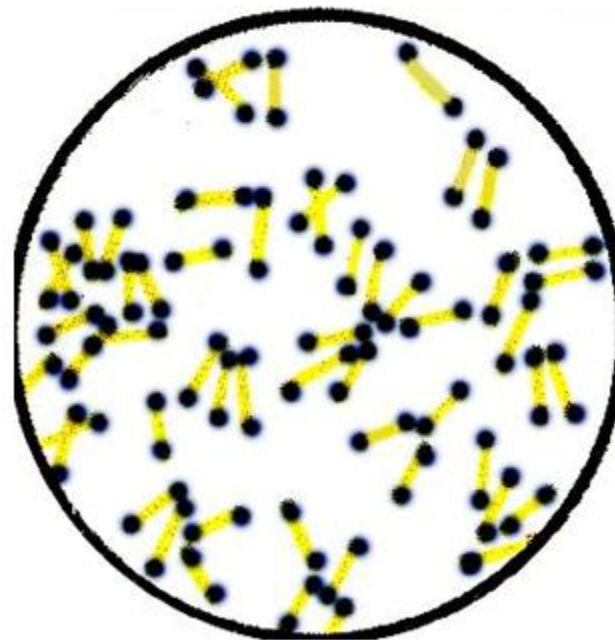


Окраска по методу Нейссера

Зерна волютина у коринебактерий



*Окраска по методу
Лёффлера*

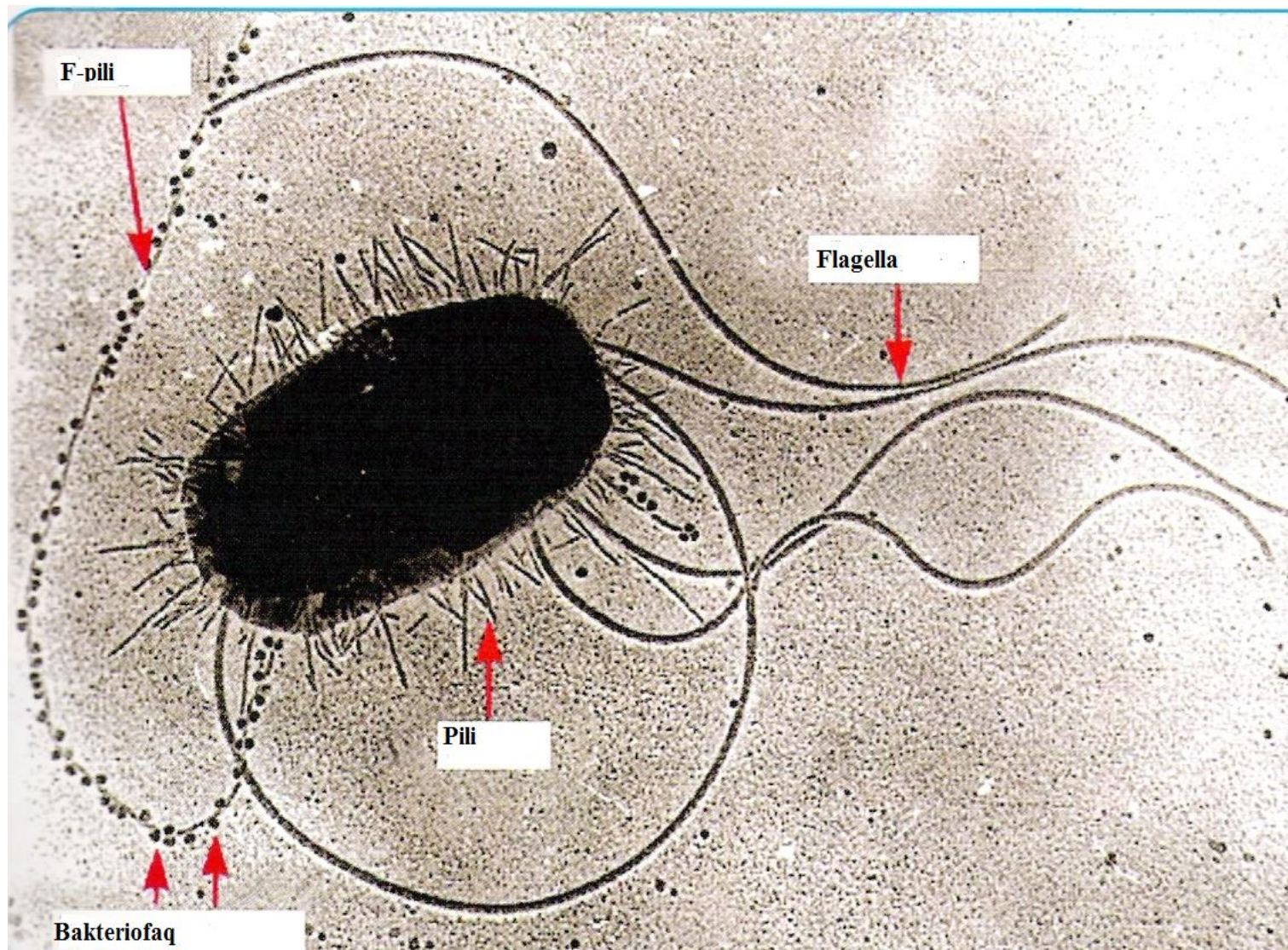


*Окраска по методу
Нейссера*

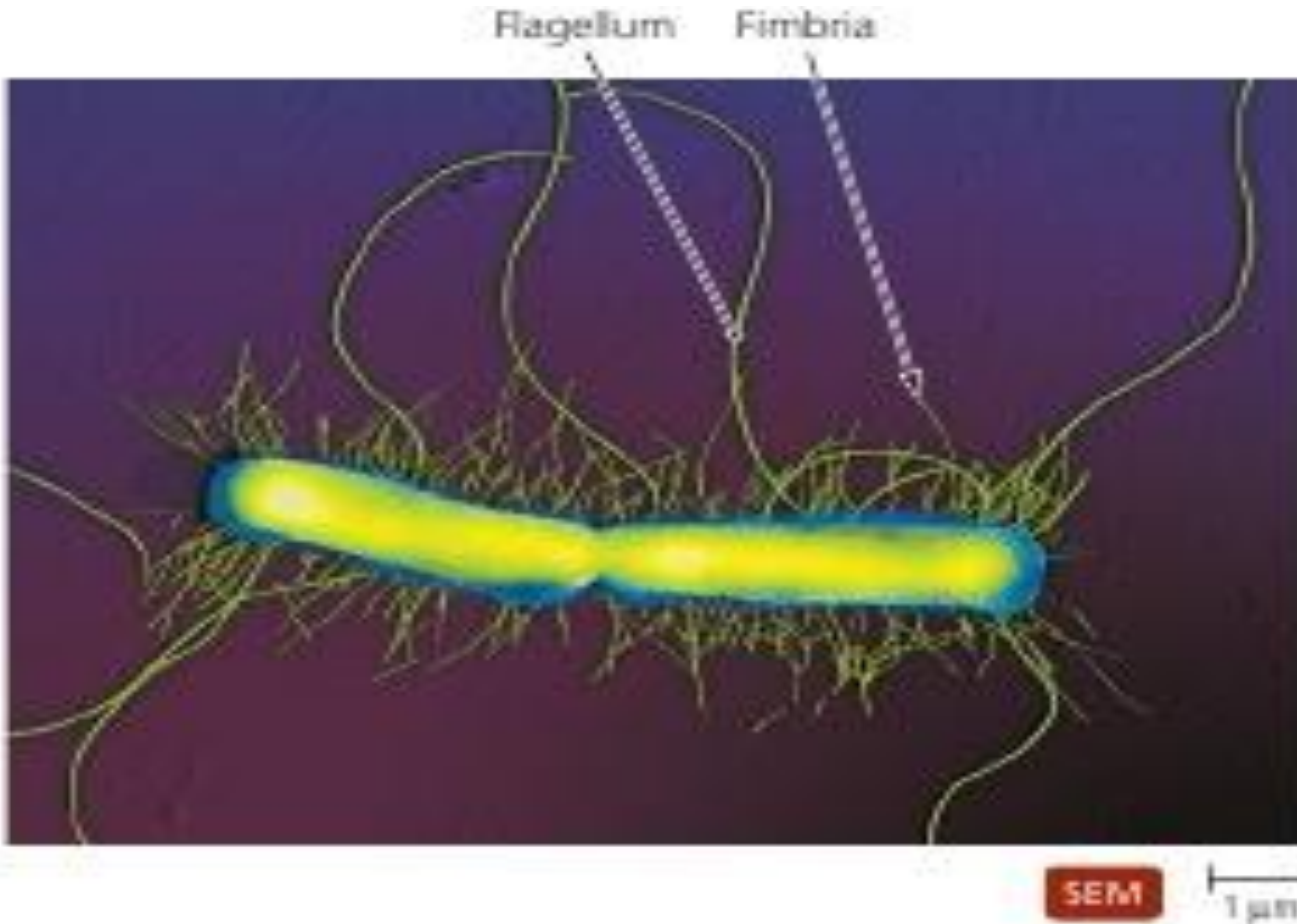
Жгутики

- ✓ *Орган подвижности, состоящий из белка флагеллина*
- ✓ *Обуславливает 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 (H-антиген), субъединицы флагеллина закручены в виде спирали*
- ✓ *В движении спирохет участвуют **фибриллы**, прикрепленные к концам клетки и направленные навстречу друг другу (эндофлагеллы)*

Жгутики и пили бактерий

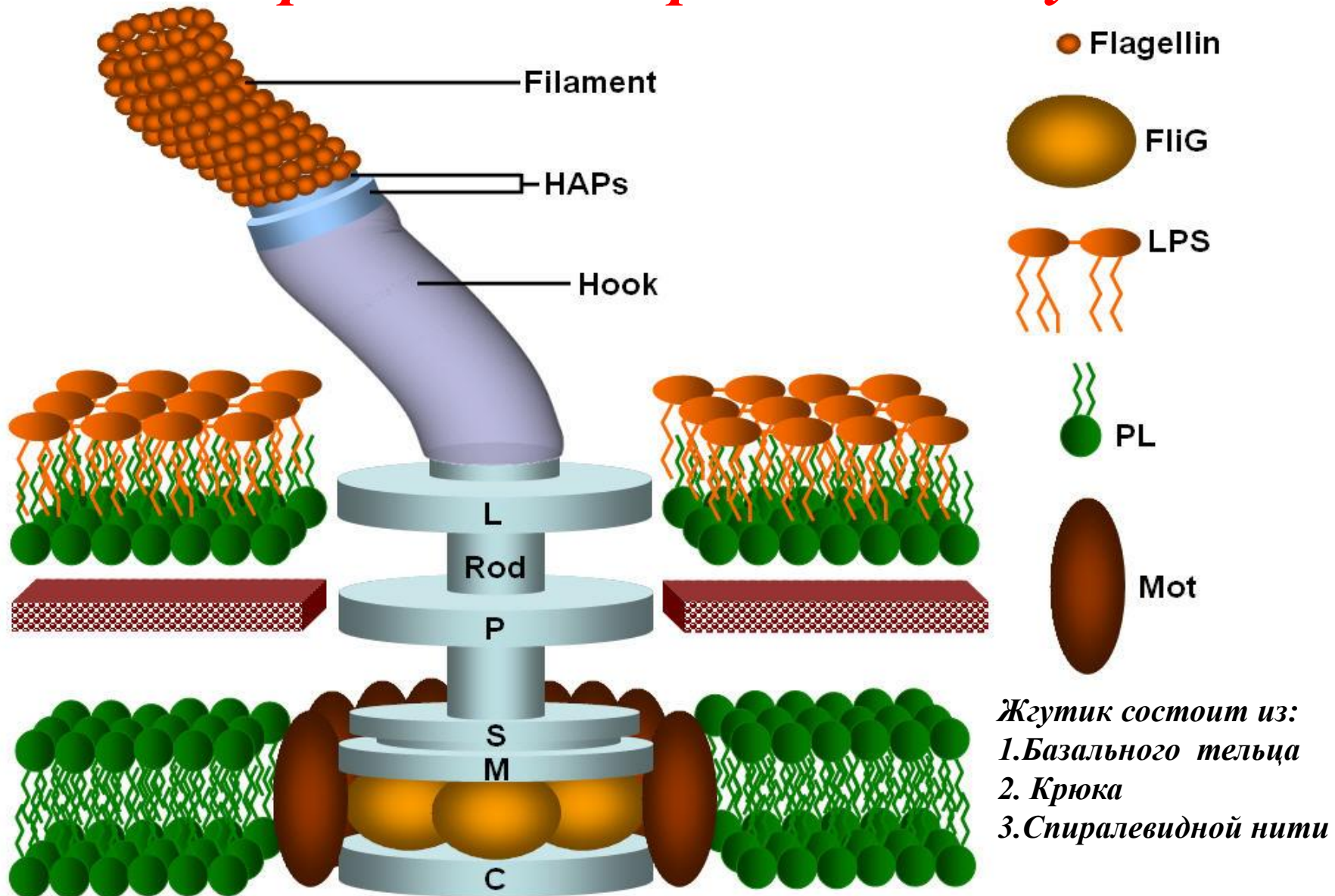


Жгутики и пили бактерий

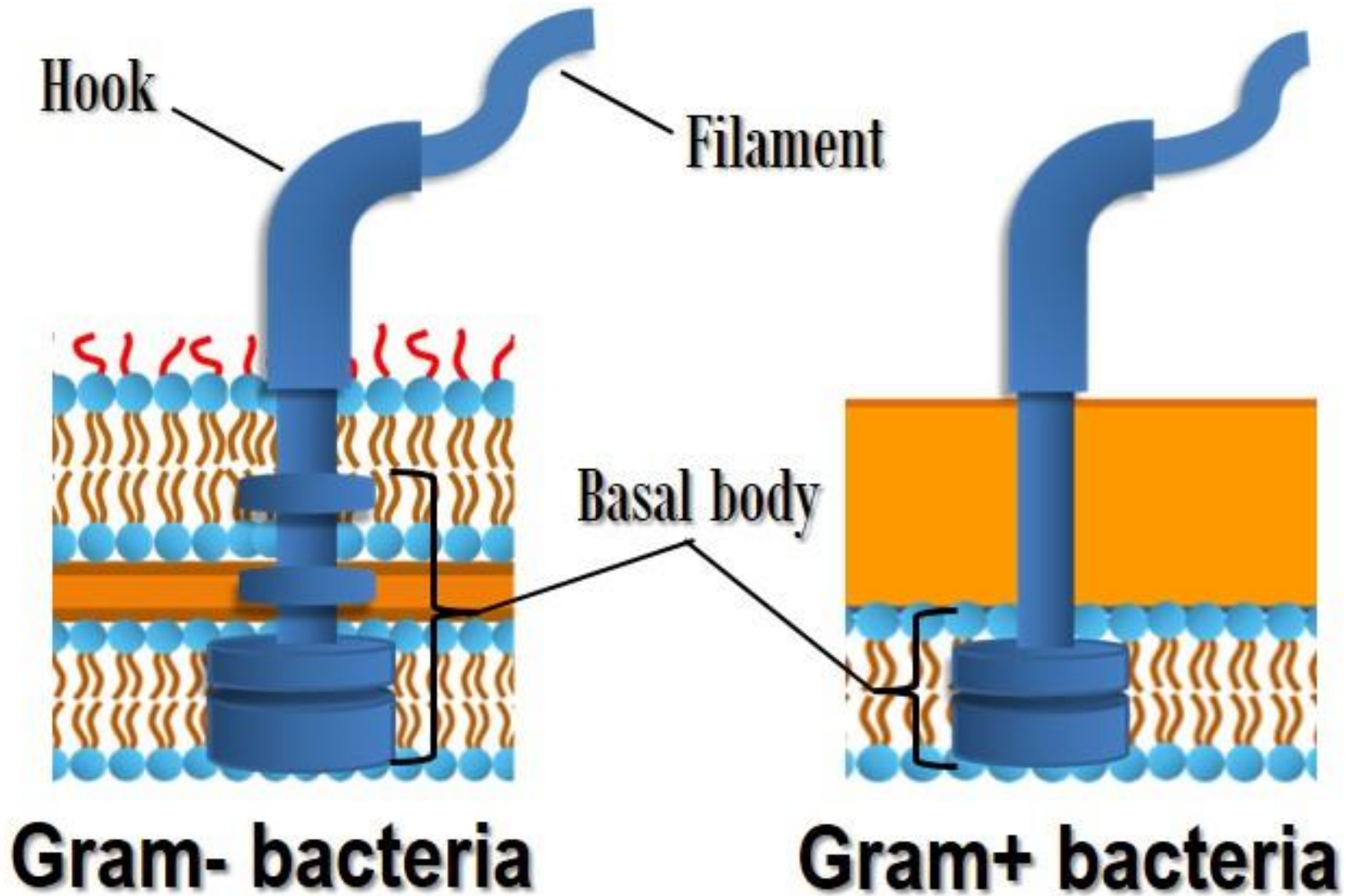


▲ **Figure 3.10** Fimbriae. *Proteus vulgaris* has flagella and fimbriae.

Схема строения бактериальных жгутиков



СТРОЕНИЕ ЖГУТИКОВ ГРАМ(-) И ГРАМ(+) БАКТЕРИЙ



По расположению жгутиков различают

<i>Атрих</i>	<i>Shigella, Klebsiella, Acinetobacter</i>
<i>Монотрих</i>	<i>Campylobacter, V.cholera, Pseudomonas</i>
<i>Лофотрих</i>	<i>Helicobacter</i>
<i>Амфитрих</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Перитрих</i>	<i>E.coli, Proteus, Salmonella</i>

РАСПОЛОЖЕНИЕ ЖГУТИКОВ

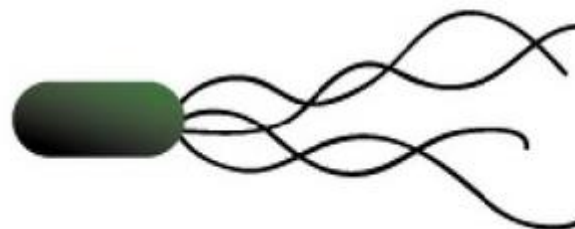
Монотрихи

Vibrio, Caulobacter



Лофотрихи

Pseudomonas, Chromatium



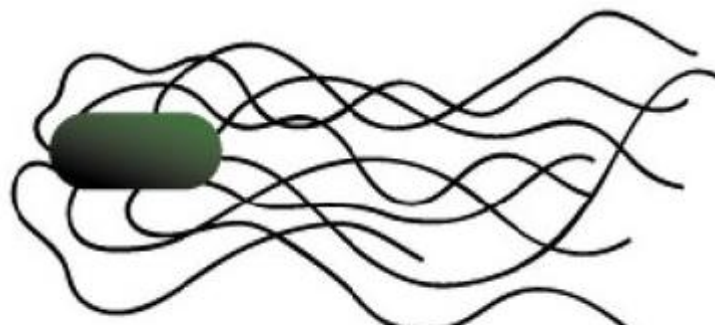
Амфитрихи

Spirillum



Перитрихи

Escherichia, Proteus

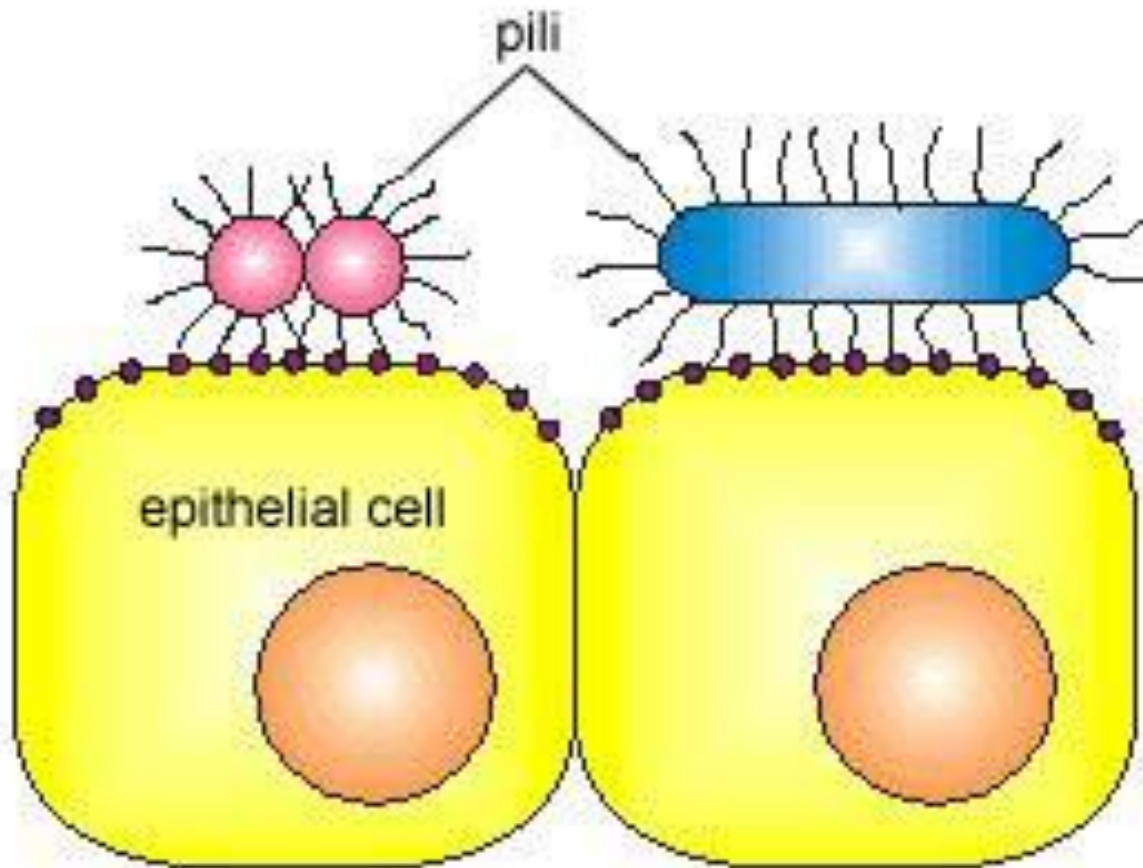


Пили (фимбрии, микроворсинки)

- ***Состоят из белка пилина***
- ***Отходят от цитоплазматической мембраны***

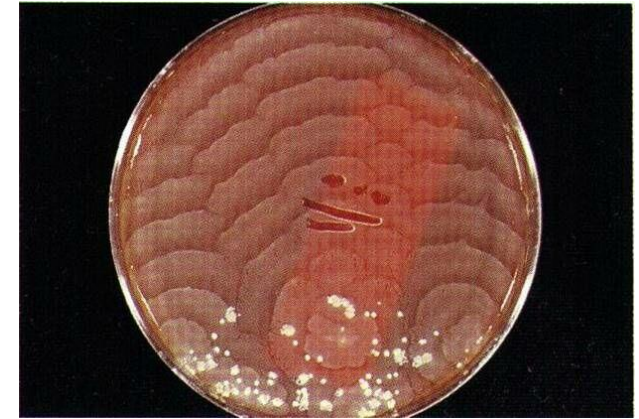


Адгезивные пили - как фактор патогенности



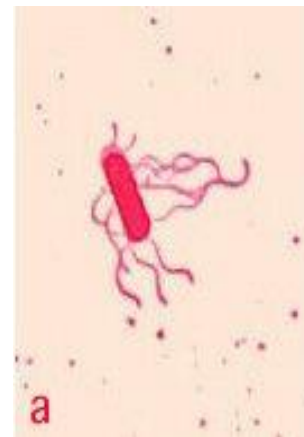
ИЗУЧЕНИЕ ПОДВИЖНОСТИ БАКТЕРИЙ

- *Прямой метод* → “феномен роения”
- *Метод Шукевича* - применяется для получения чистой культуры протей и других микроорганизмов обладающих «ползущим» ростом.



Proteus spp.

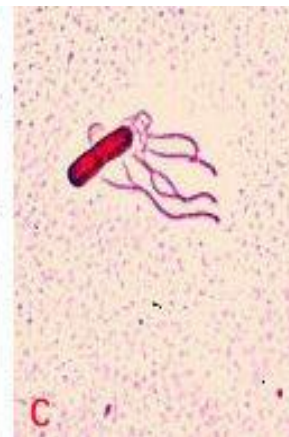
1. *Препараты “раздавленная и висячая” капля*
2. *Витальная окраска*
3. *Метод Леффлёра – протравливание смесью растворов фуксина, танина и раствора сернокислого Fe и докрашивание карболовым фуксином*



B. cereus



V. cholerae



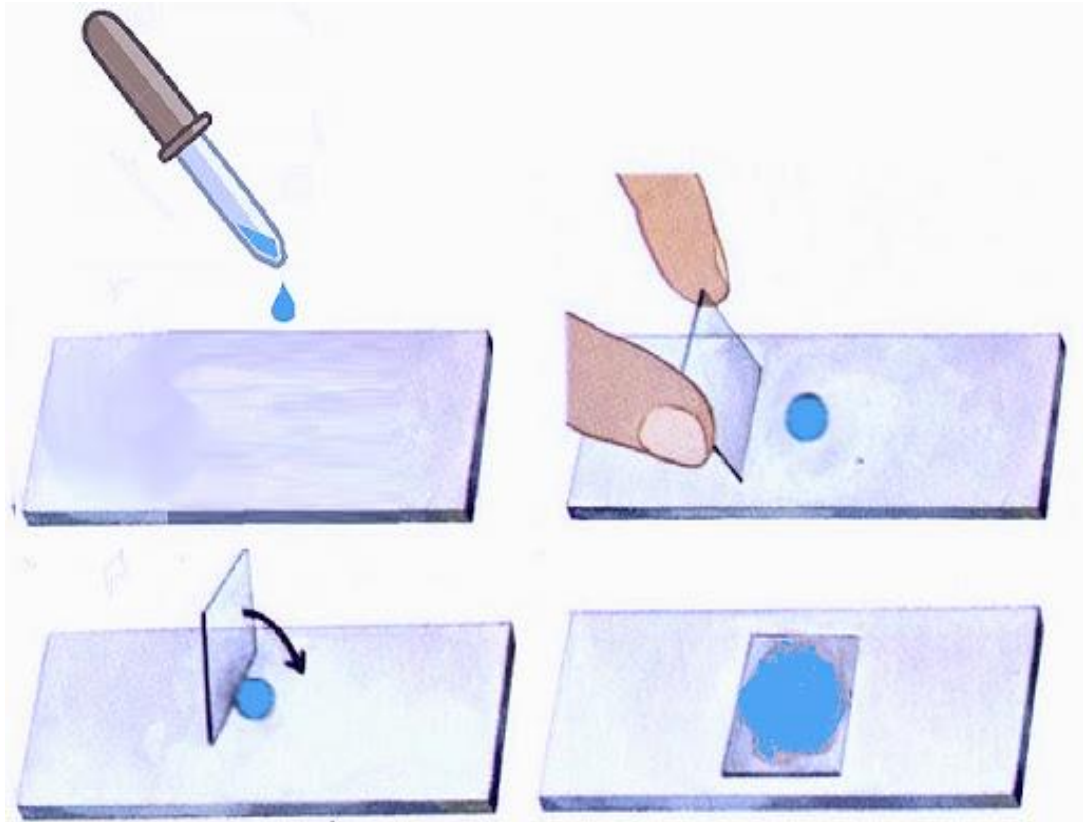
B. brevis

Приготовление препарата «висячая капля»

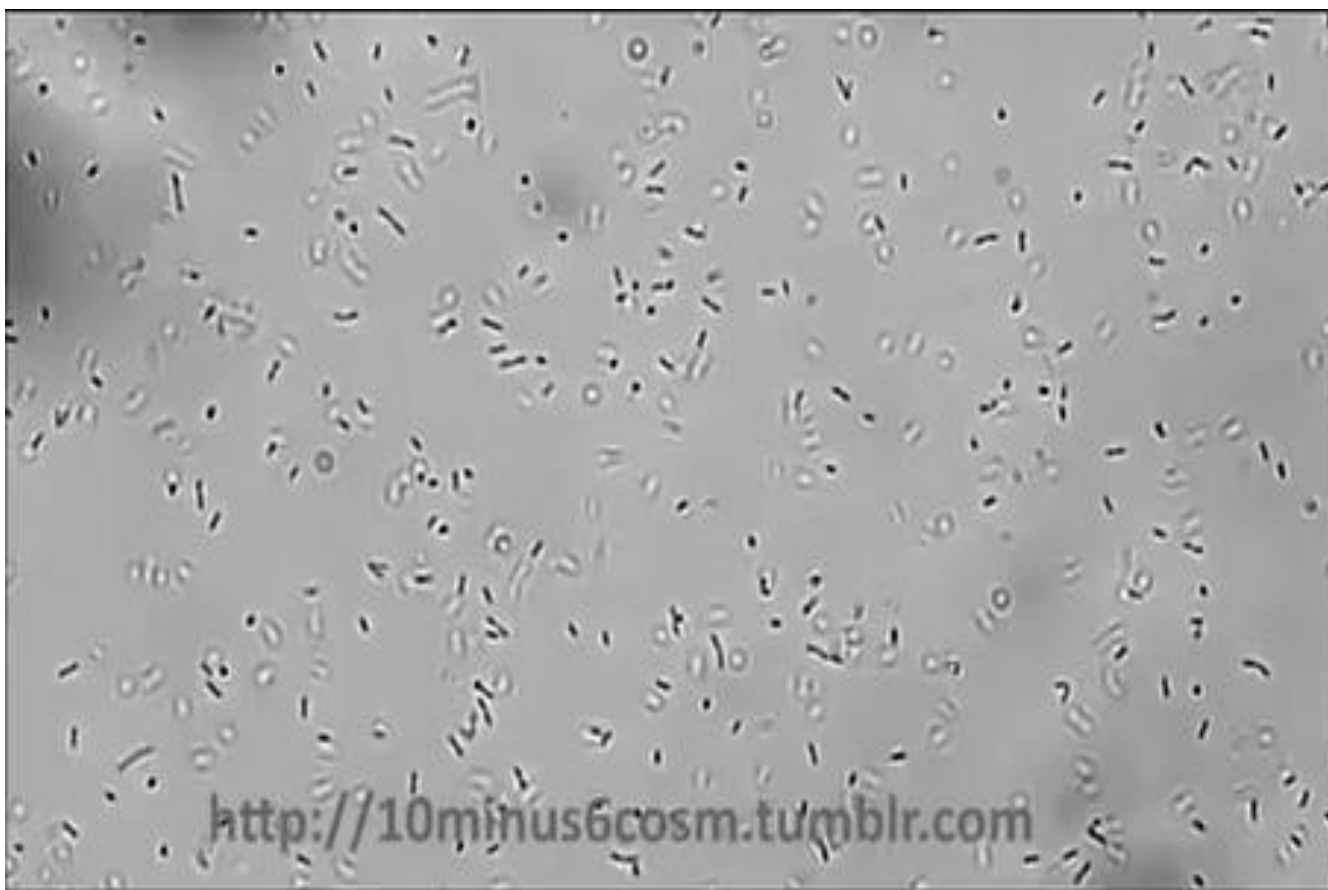
Препарат «раздавленная» капля готовят для изучения подвижности

На середину предметного стекла наносят каплю исследуемого материала и накрывают покровным стеклом

Приготовленные препараты рассматривают в затемненном поле зрения светового микроскопа

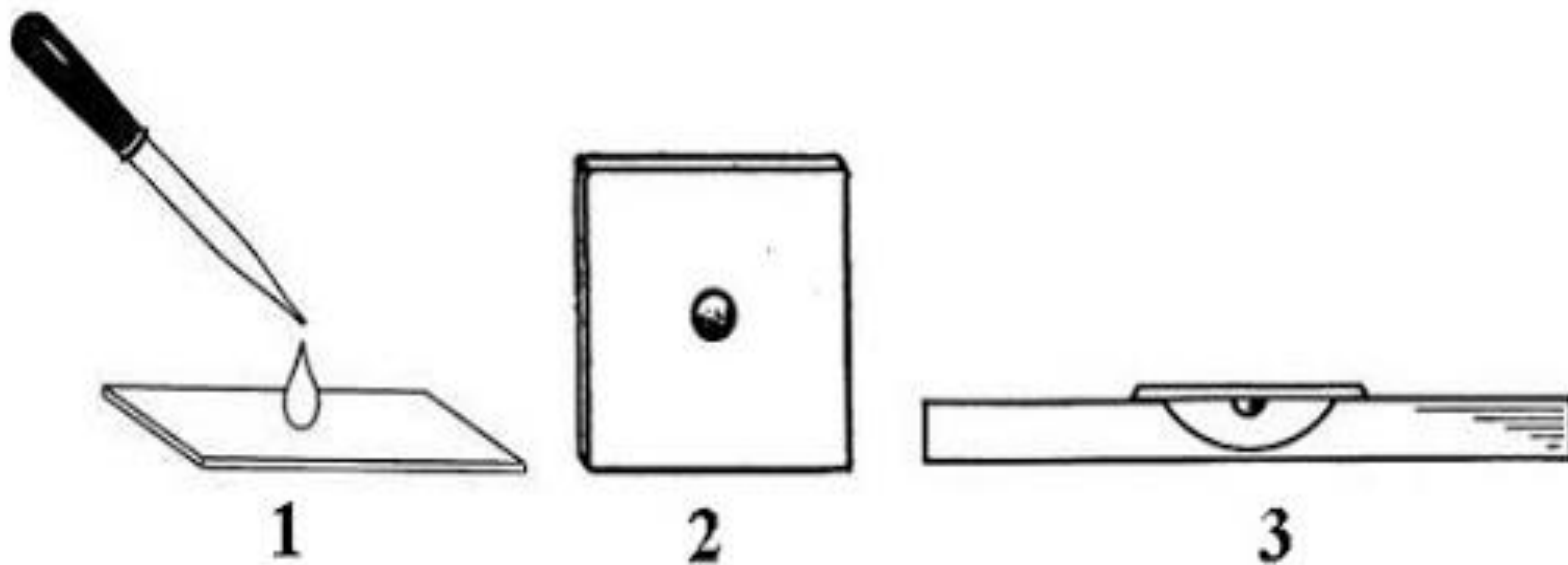


*Микроскопическая картина препарата
«раздавленная» капля*



Препарат «висячая» капля

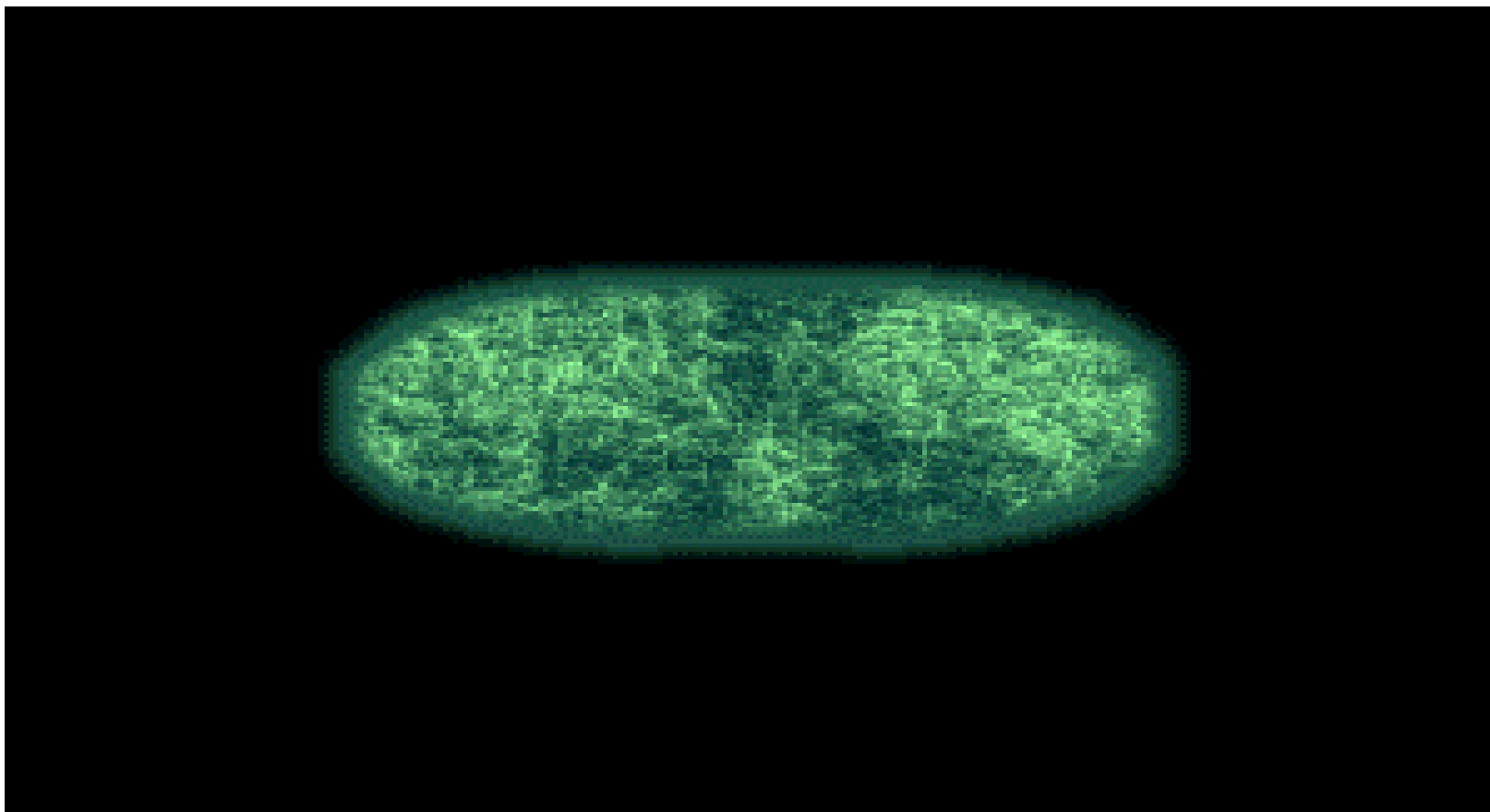
- 1-2. Небольшую каплю исследуемого материала наносят на покровное стекло***
- 3. Предметным стеклом с лункой покрывают покровное стекло и быстро переворачивают препарат покровным стеклом вверх. В этом случае капля свободно свисает не касаясь дна и краев лунки***



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*

ДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ. ВИТАЛЬНАЯ ОКРАСКА



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)*

Споруляция

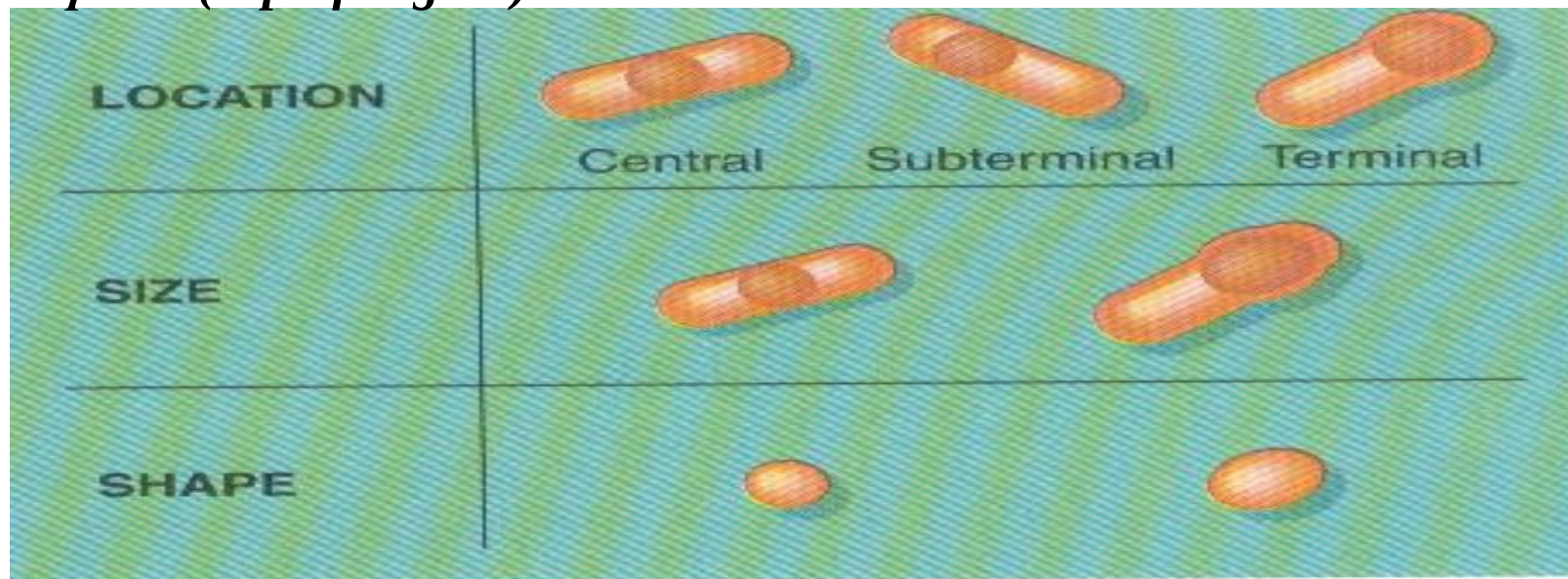
- Происходит при неблагоприятных условиях (н-р, в почве)
- Продолжается примерно 20-24 ч
- Уплотнение участка клетки с протоплазмой и нуклеоидом, и образование **проспоры**
- Повышается активность ферментов
- Уникальный фермент- **дипиколинсинтетаза (5-10%)**
- Проспора содержит **кальцевую соль дипиколоиновой 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 липопотеины и небольшое количество углеводов

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*)

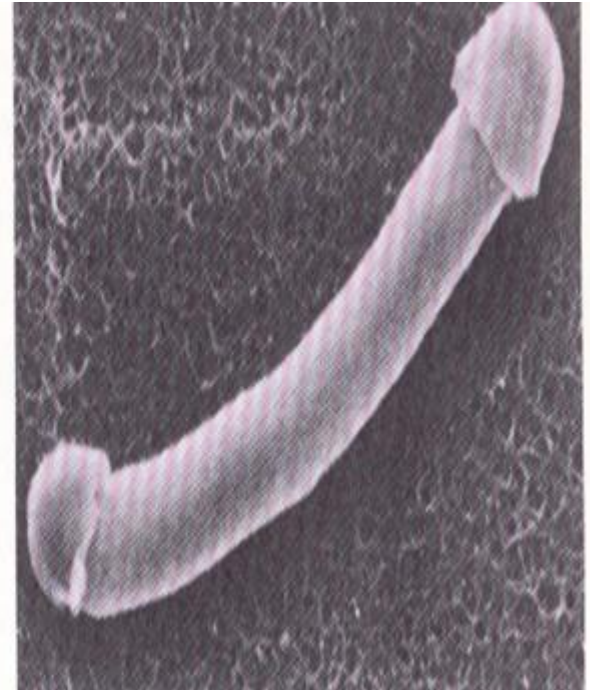
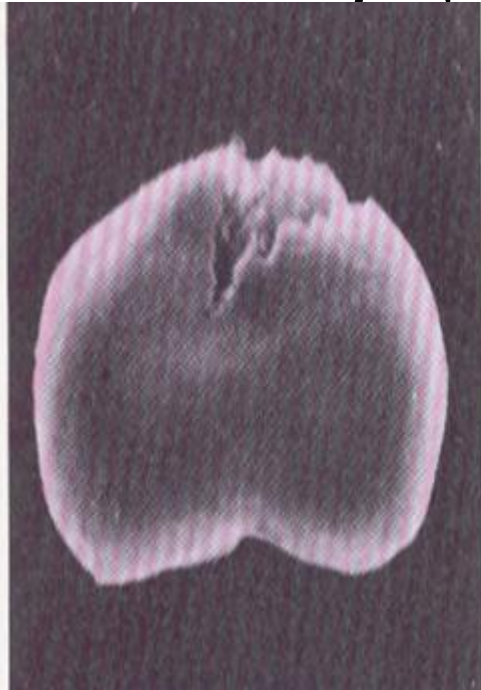


(a)



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.



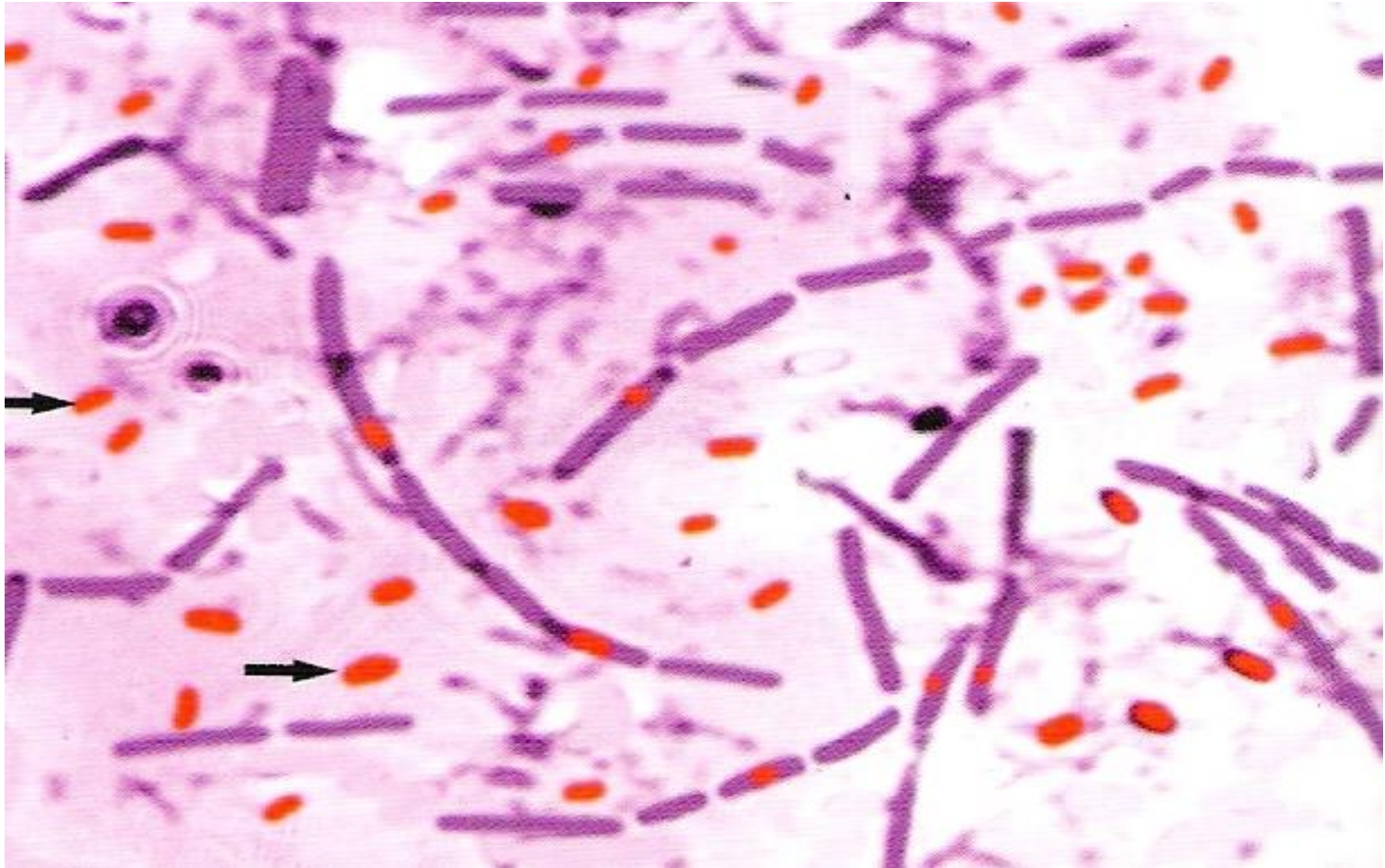
Методика окраски споры по методу Ожешко

На высушенный, не фиксированный мазок наливают 0,5% р-р НСЛ и подогревают над пламенем горелки до появления паров (2-3 мин).

*Остатки кислоты сливают, мазок после охлаждения **промывают** водой, высушивают, **фиксируют** в пламени горелки*

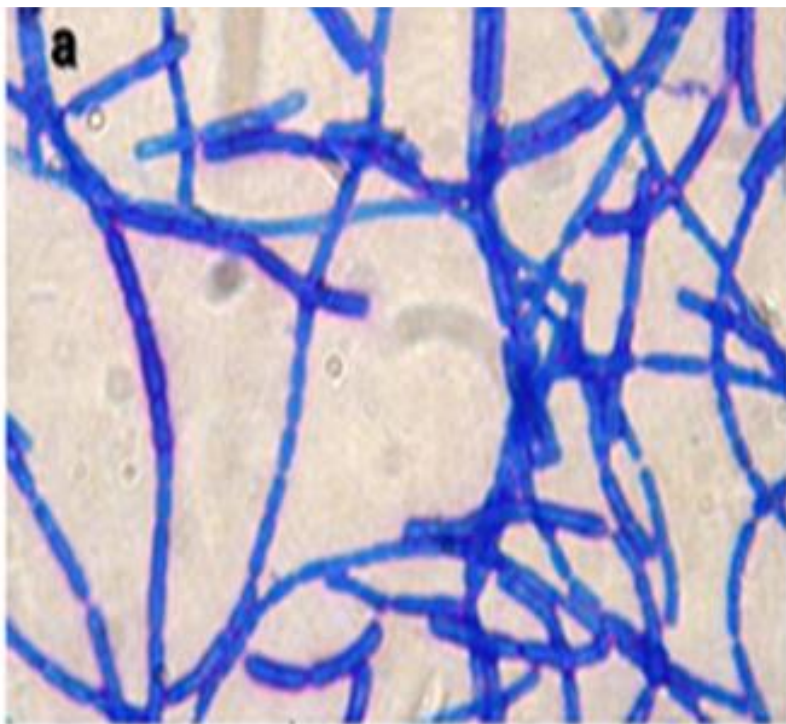
*Далее препарат окрашивается по методу Циля-Нильсена. Споры окрашиваются в **красный** цвет, вегетативные клетки - в **синий**. Карболовая кислота смягчает оболочку споры и повышает ее тинкториальные свойства, и обе формы окрашиваются в **красный** цвет. Вегетативные формы обесцвечиваются серной кислотой, и окрашиваются метиленовым синим.*

Микроскопическое изображение мазка, окрашенного по методу Ожешко



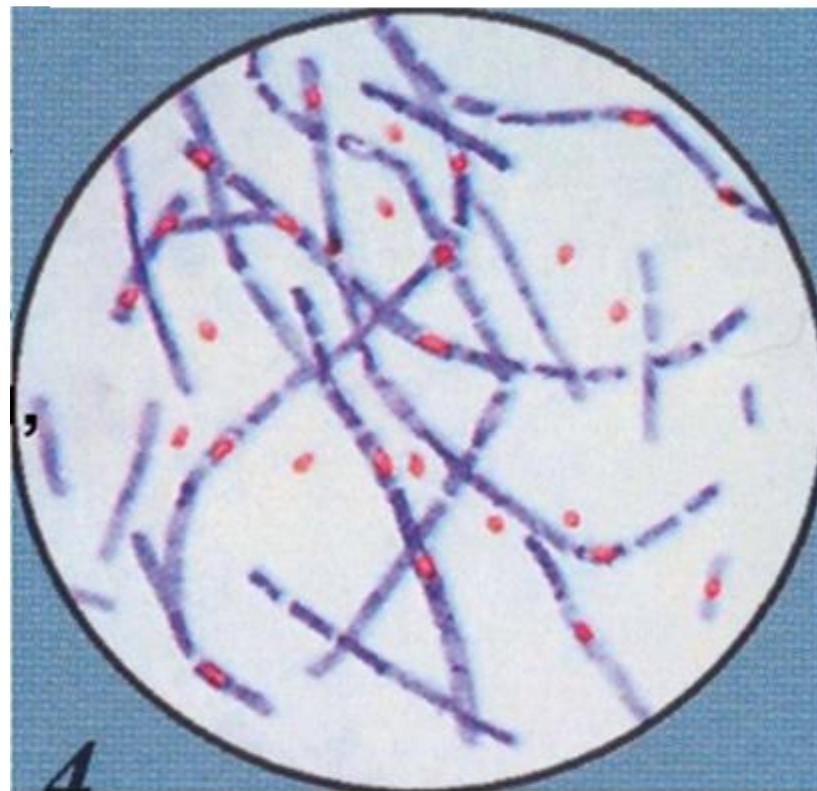
Bacillus anthracis

Вегетативная клетка



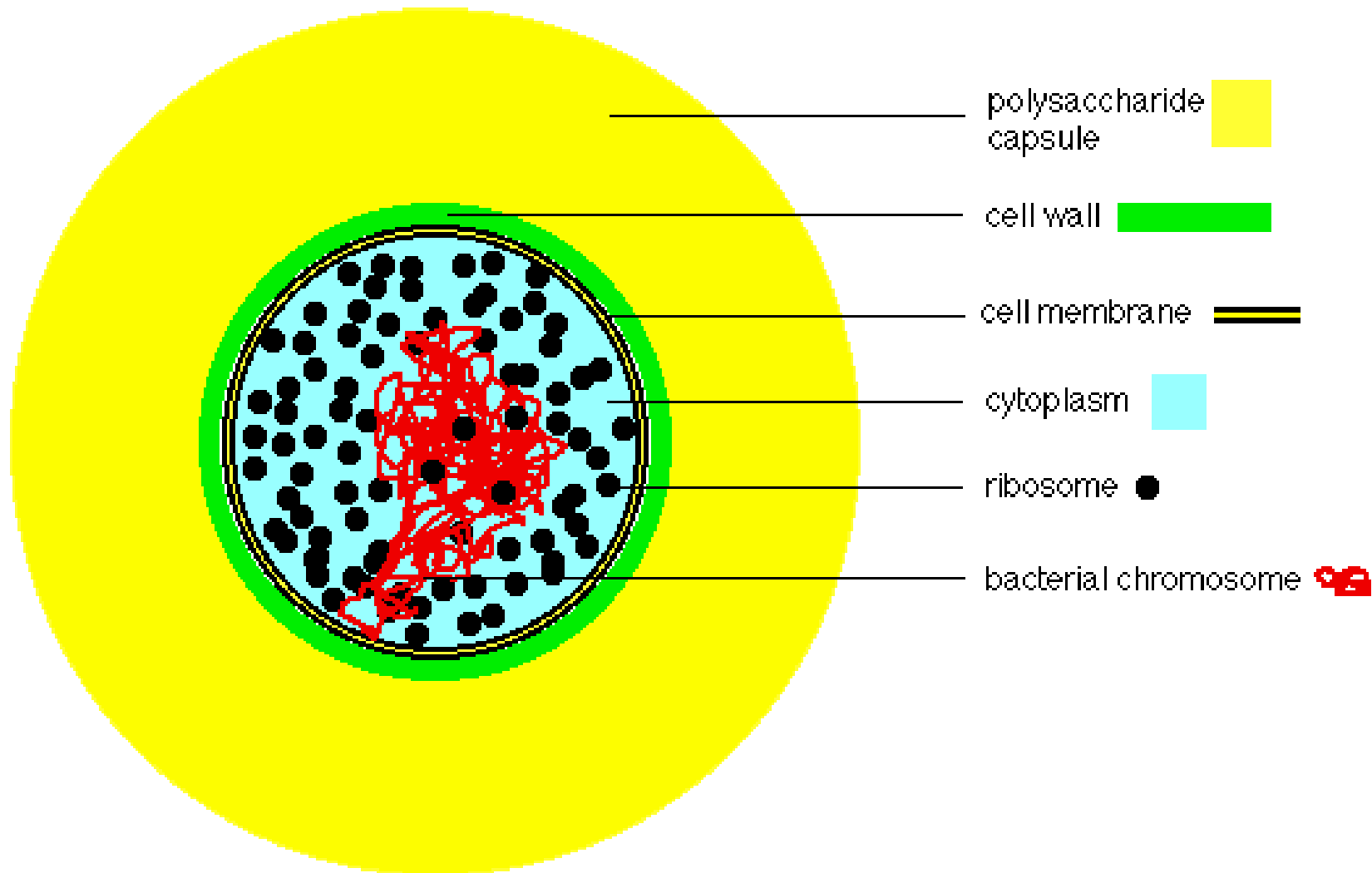
*Окраска вегетативной клетки
метиленовым синим*

Спора



Окраска споры по методу Ожешко

Anatomy of a Bacterial Cell



ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ КАПСУЛЫ

Полисахариды – *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella*

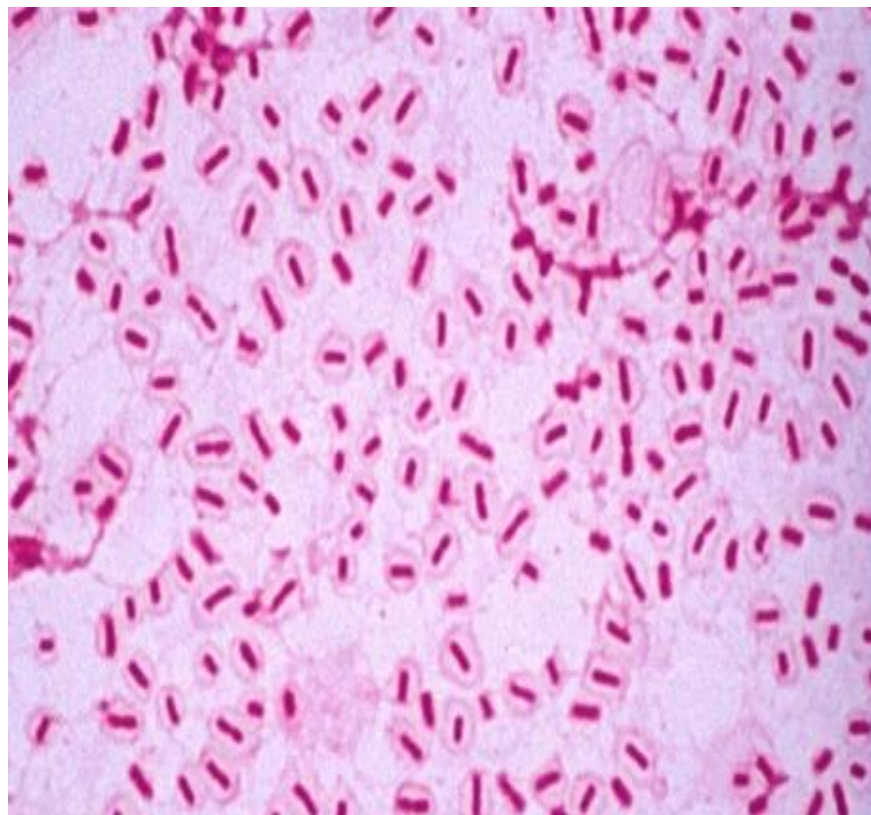
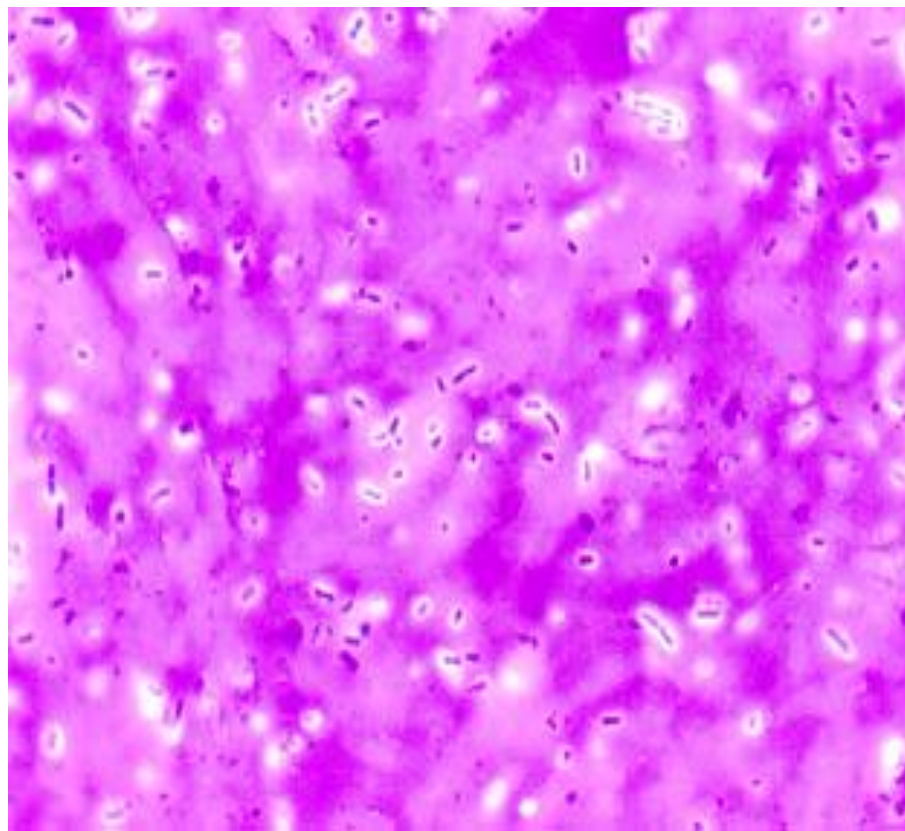
Белки - *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*

Гиалуроновая кислота- *Streptococcus pyogenes*

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*

Микроскопическая картина мазка, окрашенного по методу Бурри-Гинса



*Микроскопическая картина мазка,
окрашенного по методу Бурри-Гинса*

