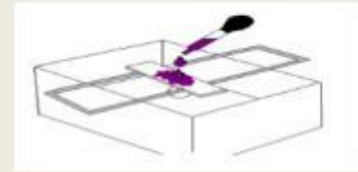


Морфология микроорганизмов. Методы окраски.

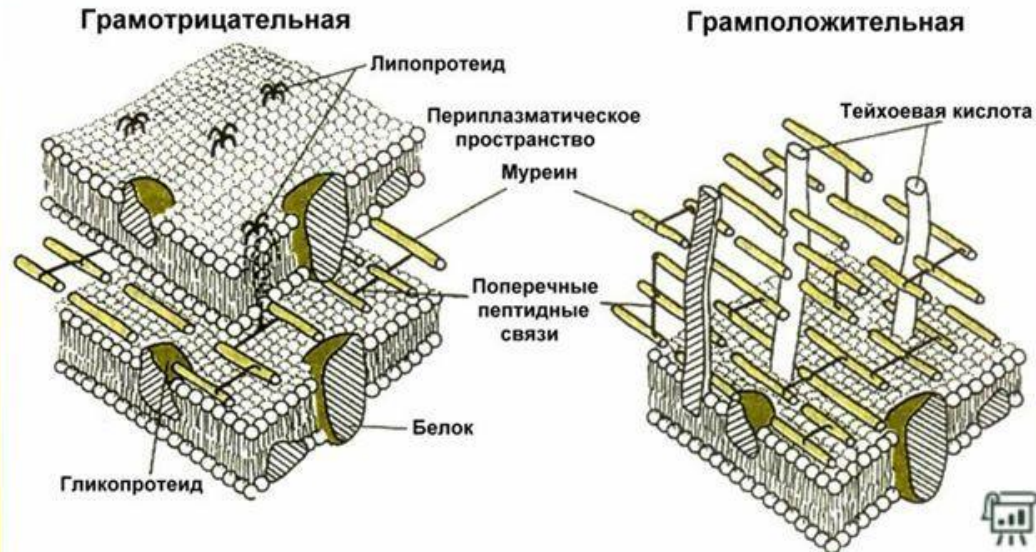


Строение бактерий

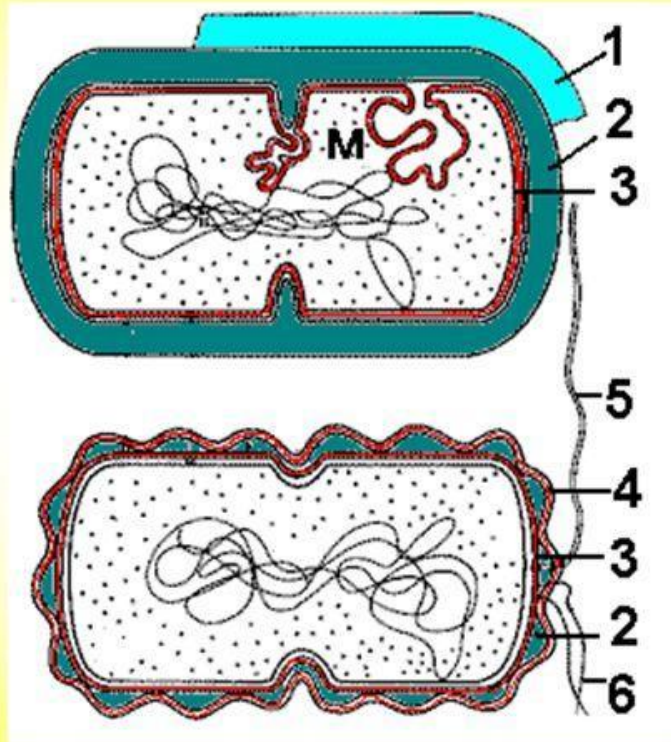
Клеточная стенка

Бактериальная клетка заключена в плотную, жесткую клеточную стенку, на долю которой приходится от 5 до 50% сухой массы клетки. Клеточная стенка выполняет роль наружного барьера клетки, устанавливающего контакт микроорганизма со средой.

Основным компонентом клеточной стенки бактерий является полисахарида — **муреин**. По содержанию муреина все бактерии подразделяются на две группы: **грамположительные** и **грамотрицательные**.

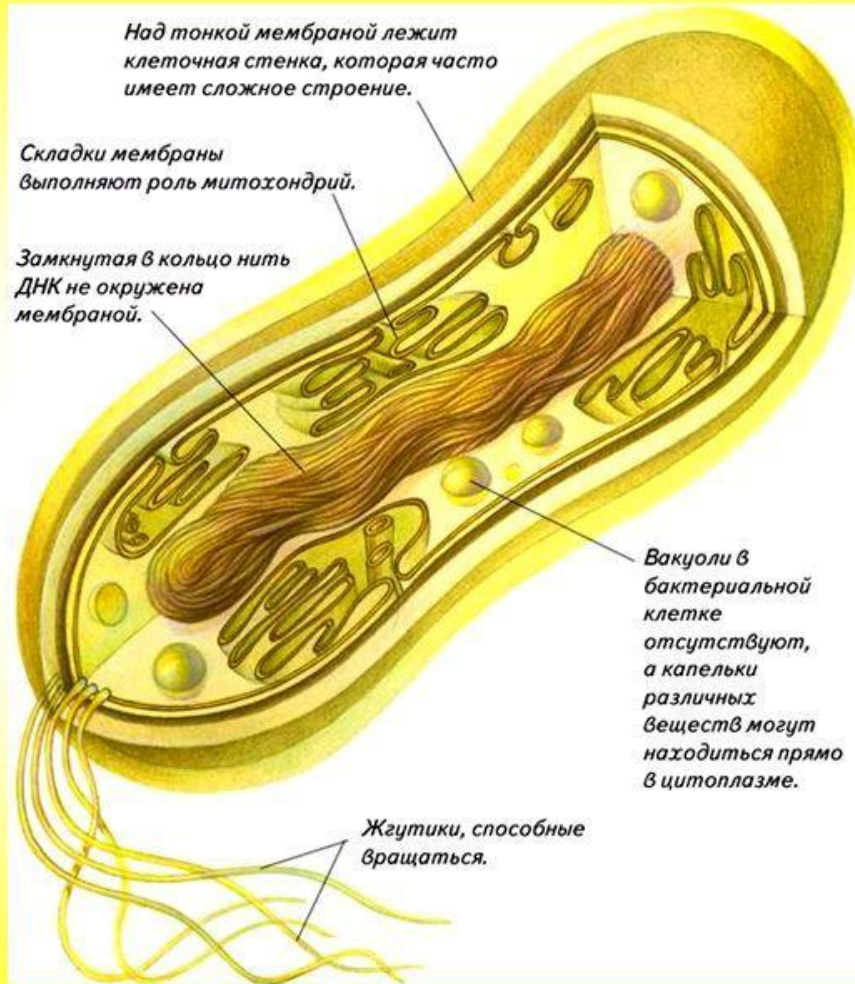


Строение бактерий



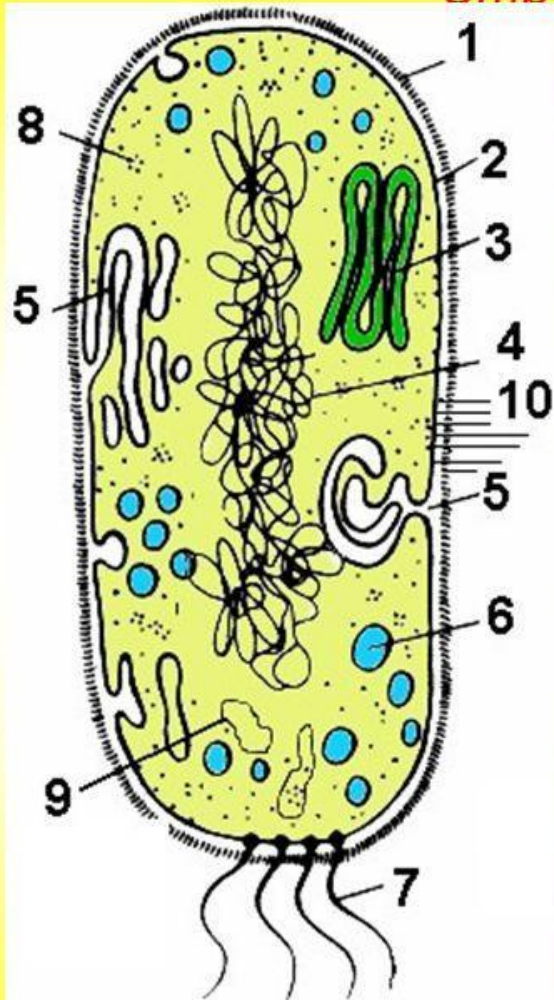
У многих бактерий поверх клеточной стенки располагается слизистый матрикс — **капсула**. Капсулы образованы полисахаридами. Иногда в состав капсулы входят полипептиды. Как правило, капсула выполняет защитную функцию, предохраняя клетку от действия неблагоприятных факторов среды. Кроме того, она может способствовать прикреплению к субстрату и участвовать в передвижении.

Строение бактерий



Цитоплазматическая мембрана регулирует поступление питательных веществ в клетку и выход продуктов метаболизма наружу. Обычно темпы роста цитоплазматической мембраны опережают темпы роста клеточной стенки. Это приводит к тому, что мембрана часто образует многочисленные инвагинации (впячивания) различной формы — **МЕЗОСОМЫ**.

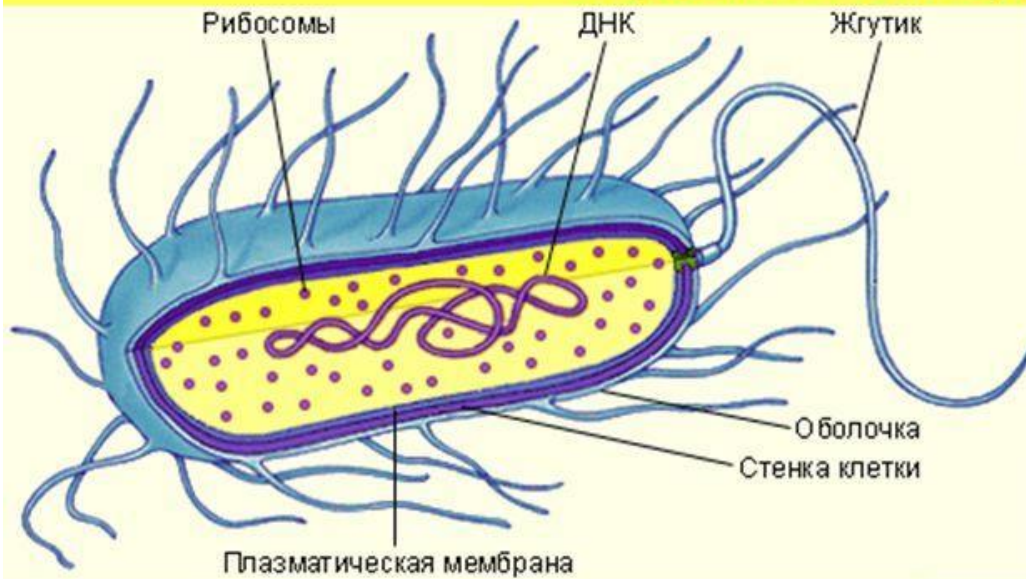
Строение бактерий



В клетках фотосинтезирующих бактерий имеются внутрицитоплазматические мембранные образования — *хроматофоры*, обеспечивающие протекание бактериального фотосинтеза.

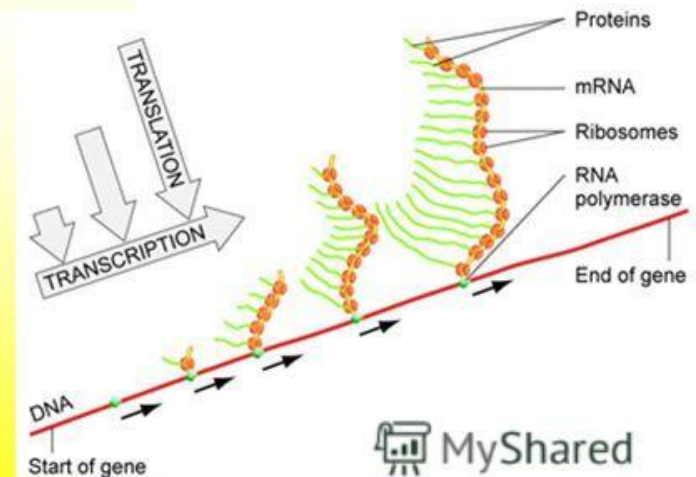


Строение бактерий



station of micrograph

Для бактерий характерны **70S-рибосомы**, образованные двумя субъединицами: 30S и 50S. Рибосомы бактериальных клеток собраны в **полисомы**, образованные десятками рибосом.



Строение клеточной стенки бактерий

Firmicutes (грамположительные)	Gracillicutes (грамотрицательные)
Пептидогликан многослойный	Пептидогликан однослойный
Есть полимеры тейхоевых кислот	Нет тейхоевых кислот
Нет внешней мембраны	Есть внешняя мембрана (состоит из фосфолипидов, белков, полисахаридов и липополисахаридов)
По Граму – фиолетовый цвет	По Граму – розовый цвет
Под действием лизоцима образуют протопласты	Под действием пенициллина образуют сферопласты

Строение клеточной стенки бактерий

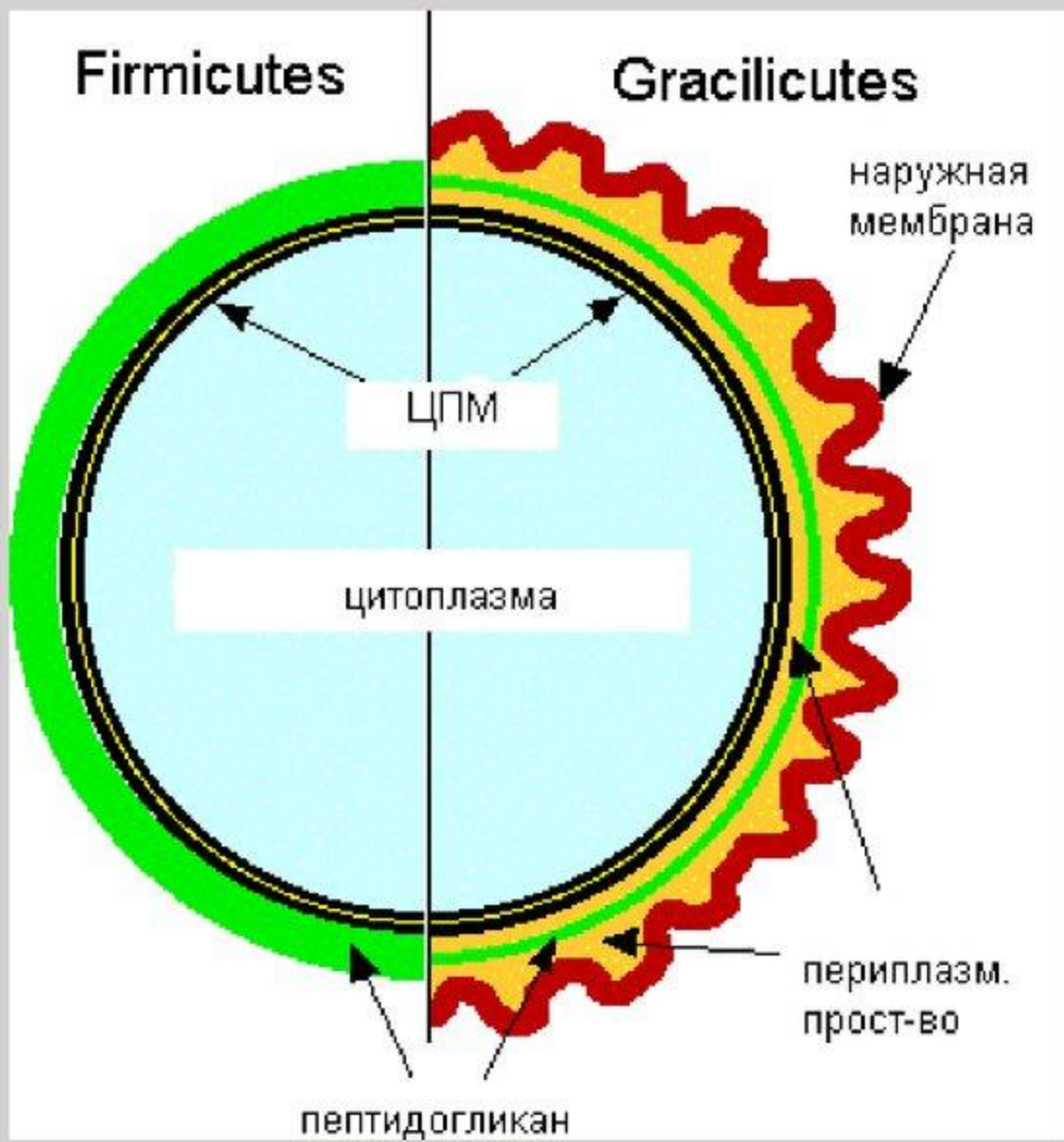
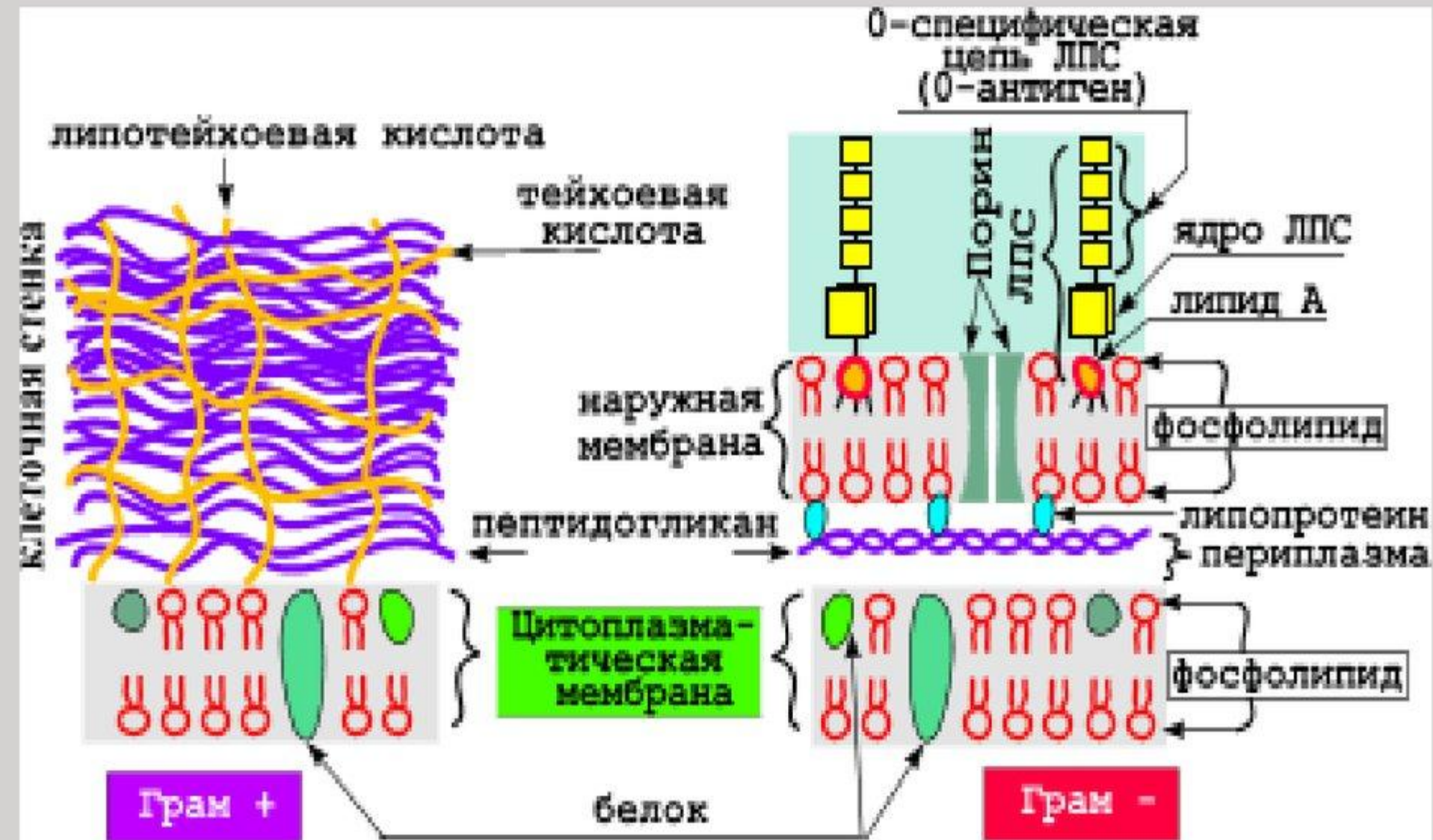


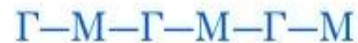
Схема строения оболочек

грамположительных и грамотрицательных бактерий



Строение пептидогликана грамположительных бактерий

- **Пептидогликан** имеет волокнистую структуру и состоит из параллельно расположенных молекул **гликана**, образованного повторяющимися остатками **N-ацетилглюкозамина (Г)** и **N-ацетилмурамовой кислоты (М)**, соединенных **гликозидной** связью



- Соседние молекулы **гликана** соединяются через N-ацетилмурамовые кислоты (М) **тетрапептидной связью** (состоит из 4 аминокислот, например, L-ала—D-глу—L-лиз—D-ала).



L-ала

L-ала

D-глу

D-глу

L-лиз-гли-гли-гли-гли-гли-L-лиз

D-ала

D-ала



- Тетрапептиды соединены друг с другом полипептидными цепочками из 5 остатков глицина = **пентаглицин**

Строение пептидогликана граммотрицательных бактерий

- **Пептидогликан** - состоит из параллельных молекул **гликана**,



- соседние молекулы **гликана** соединены **тетрапептидами**: L-ала—D-глу—**мезо-диаминопимелиновая к-та**—D-ала)

- тетрапептиды соединяются друг с другом через **D-ала** одной цепи и **мезоДАП** другой.



L-ала

L-ала

D-глу

D-глу

ДАП

ДАП

D-ала

D-ала



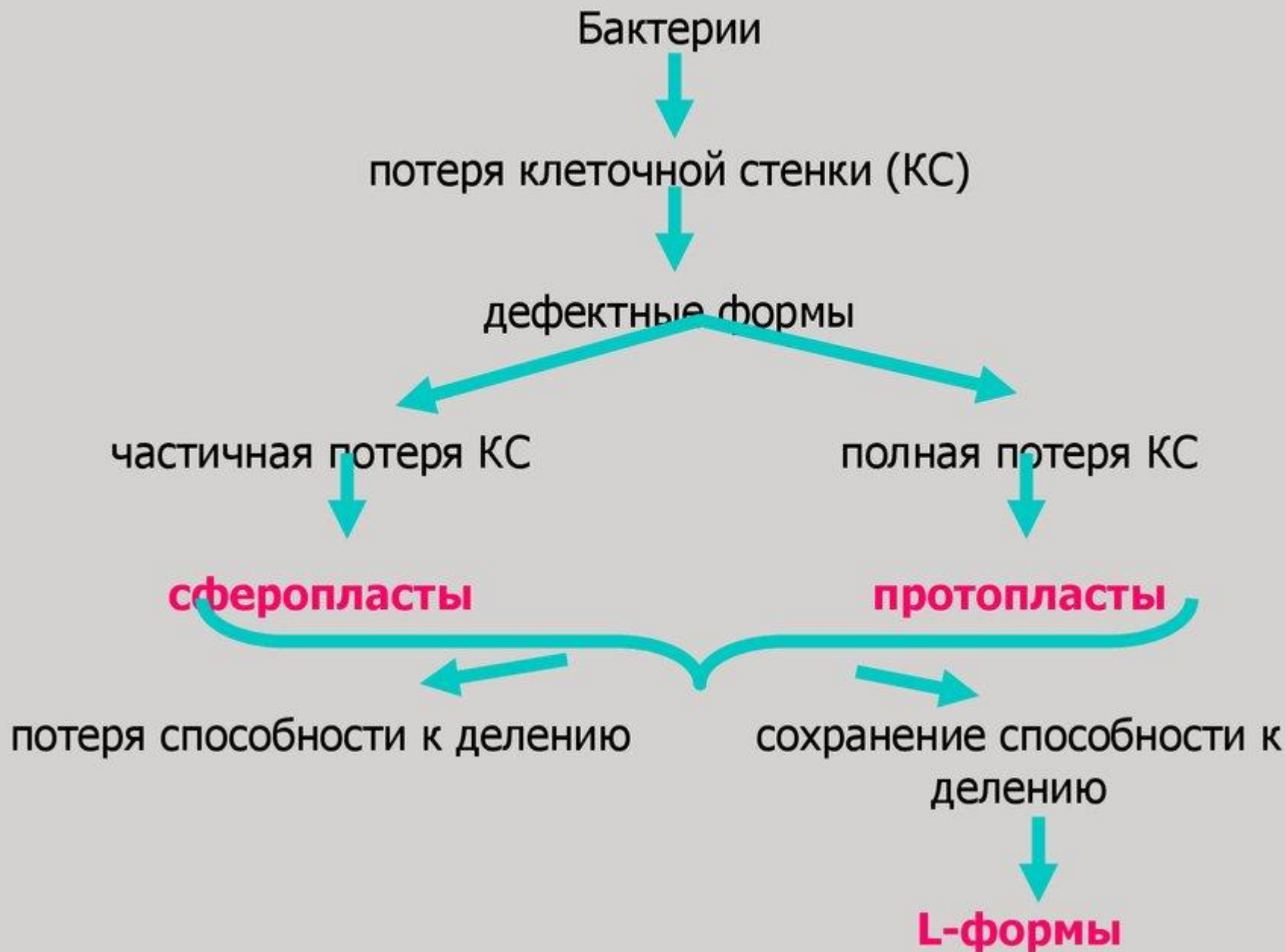
Строение наружной мембраны грамотрицательных бактерий

- **Наружная мембрана** – через **липопротеин** связана с пептидогликаном,
 - имеет вид волнообразной трехслойной структуры
 - основным компонентом является **бимолекулярный слой липидов**,
 - мозаичная структура, состоит из **липополисахарида, фосфолипидов и белков**,
 - ассиметрична:
 - внутренний слой состоит из фосфолипидов,
 - в наружном расположен липополисахарид (ЛПС)

Строение липополисахарида грамотрицательных бактерий

- **Липополисахарид** состоит из 3-х фрагментов:
 - **липид А** – одинаков у всех гр- бактерий,
 - обуславливает токсичность,
 - отождествляется с эндотоксином,
 - с его помощью ЛПС крепится в наружной мембране;
 - **ядро** = основной фрагмент (базисный) – состоит из олигосахаридов, одинаков,
 - наиболее постоянной частью ядра является кетодезоксиоктоновая к-та;
 - **высоковариабельная цепь полисахаридов** –
О- специфическая часть - обуславливает серогруппу, серовар (О-АГ).

Дефектные формы бактерий



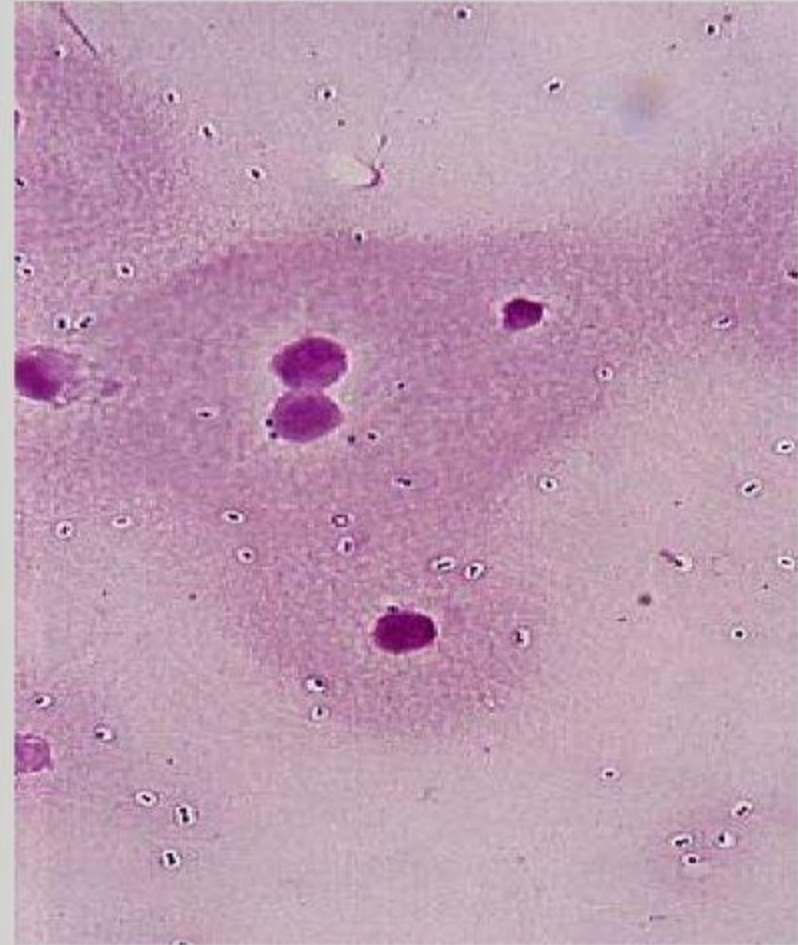
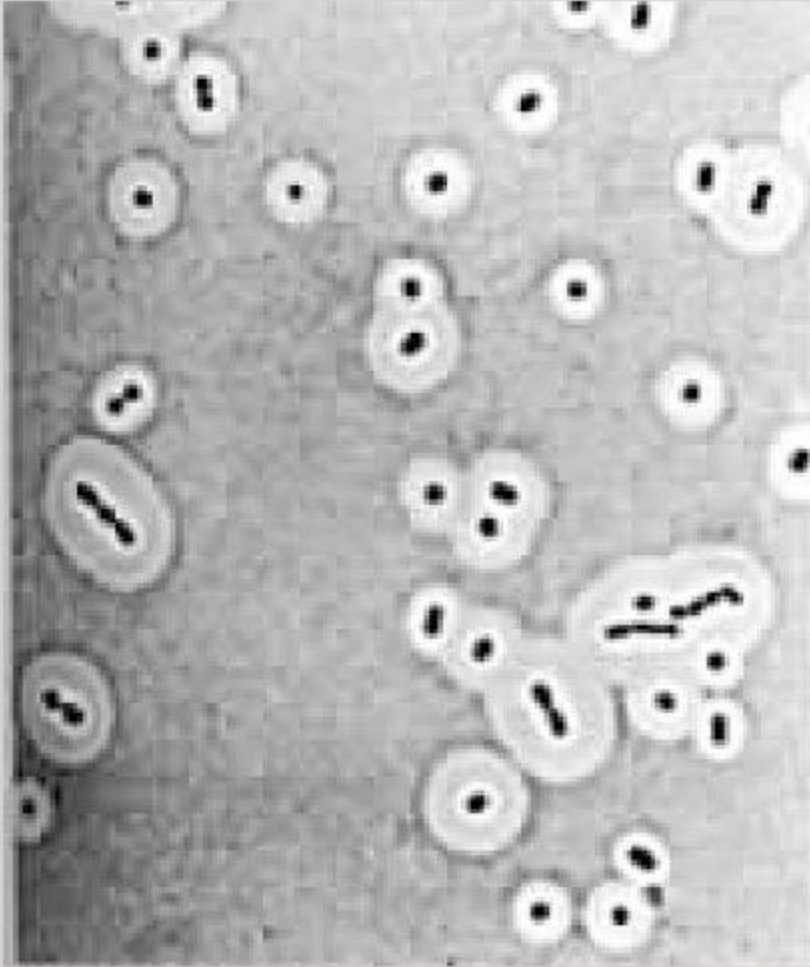
Микро- и макрокапсула бактерий

	Макрокапсула (капсула)	Микрокапсула
Определение	Выраженный слизистый слой, покрывающий КС и имеющий фибриллярное строение	Тесно прилегающие к КС мукополисахаридные фибриллы
Место образования	<ul style="list-style-type: none">• человеческий организм• питательные среды, содержащие сыворотку крови	
Состав	<ul style="list-style-type: none">• чаще – полисахариды• реже - полипептиды	мукополисахарид
Функция	Защита бактериальной клетки от: <ul style="list-style-type: none">• фагоцитов• антител	

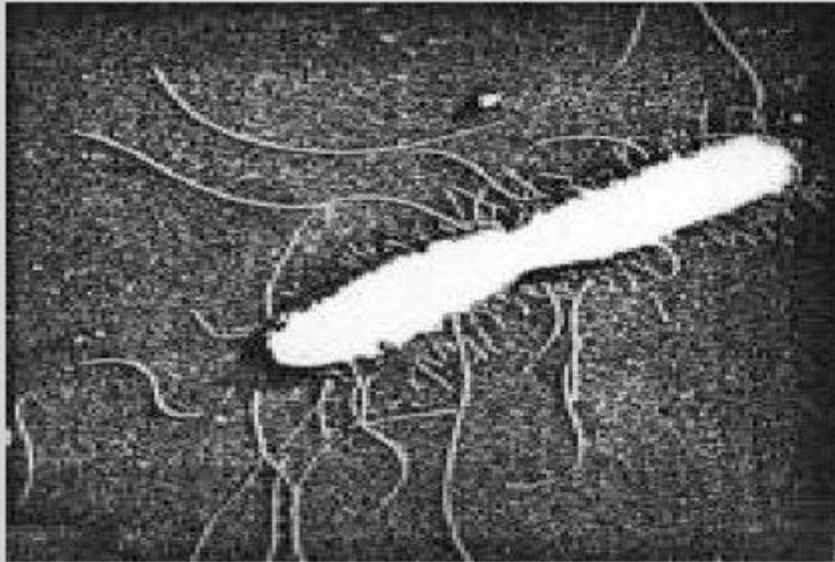
Микро- и макрокапсула бактерий

	Макрокапсула (капсула)	Микрокапсула
Бактерии, обладающие капсулой	Особенно выражена у: <ul style="list-style-type: none">• <u>клебсиелл</u> (образуется ими постоянно, даже на простых питательных средах)• <u>пневмококка</u>• <u>бацилл сибирской язвы</u>• <u>Clostridium perfringens</u>• <u>коккобактерий</u> (кроме бруцелл)	Многие бактерии
Выявление	<ul style="list-style-type: none">• В мазке из патологического материала – любым методом окраски (неокрашенный ореол вокруг бактериальной клетки)• Специальные методы окраски	Электронно-микроскопическое исследование

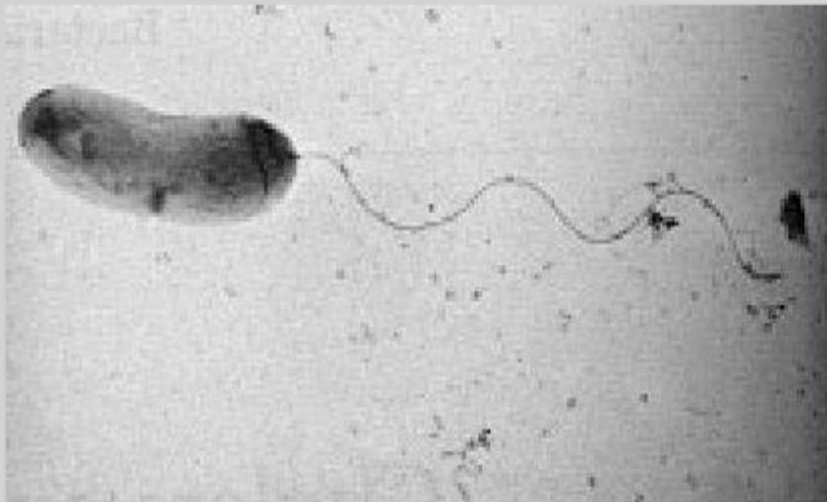
Капсула бактерий



Жгутики бактерий



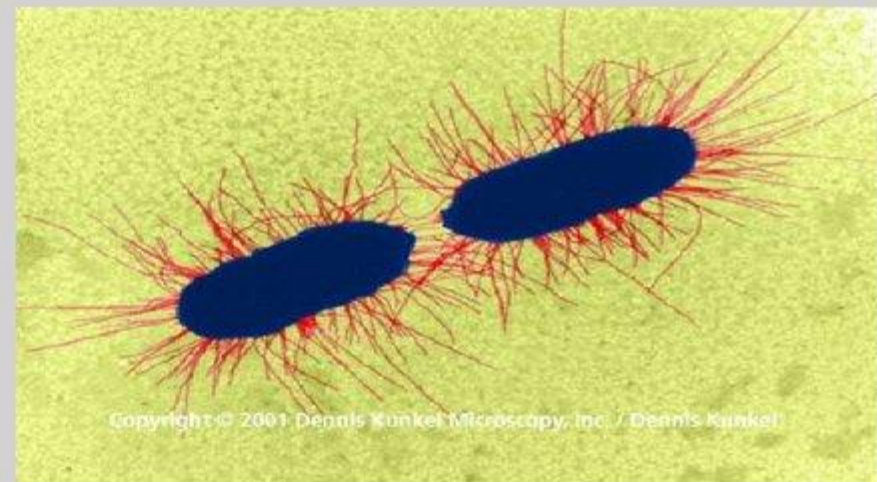
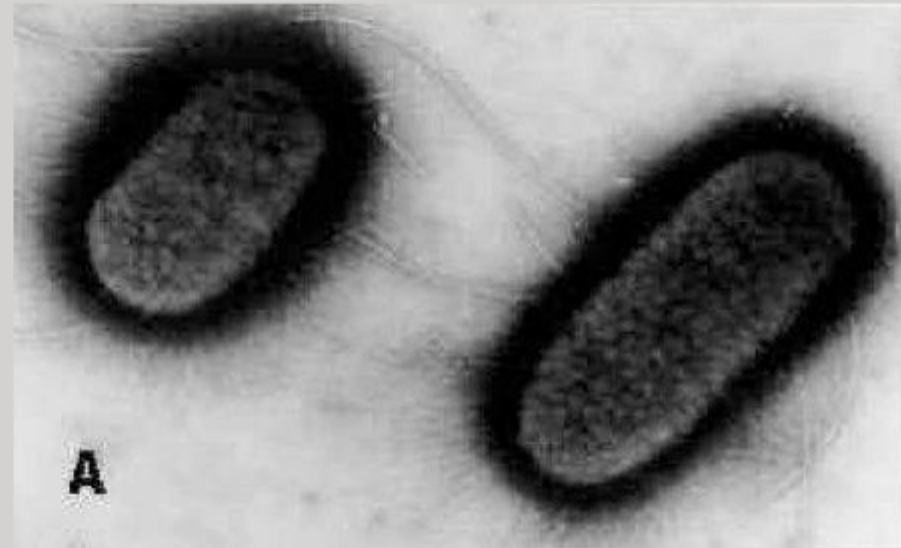
- Органы движения бактерий
 - жгутики
 - осевая нить (у спирохет)



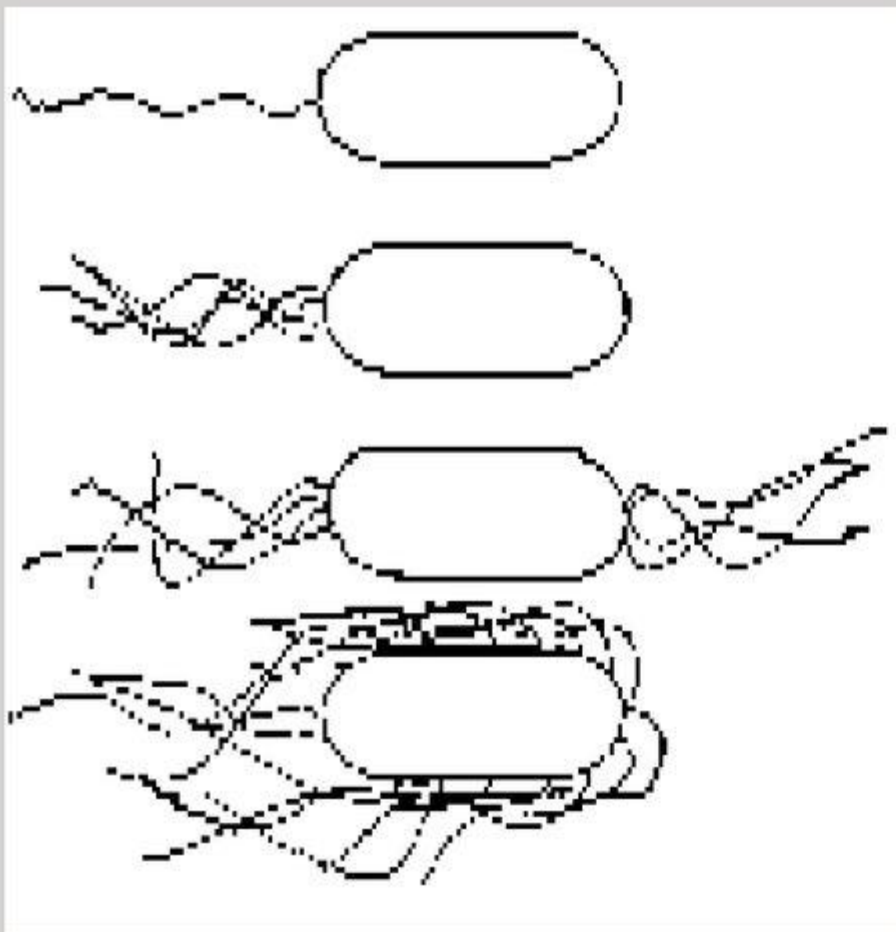
- Тип движения жгутиков
 - Вращательный

Жгутики бактерий

- **Выявление жгутиков**
- косвенное – по факту подвижности бактерий
- прямое:
 - специальные методы окраски
 - фазово-контрастная микроскопия (у лофотрихов)
 - электронная микроскопия



Классификация бактерий по числу и расположению жгутиков



– монотрихи – один на полюсе

– политрихи – много:

• лофотрихи – пучок

• амфитрихи – на противоположенных полюсах

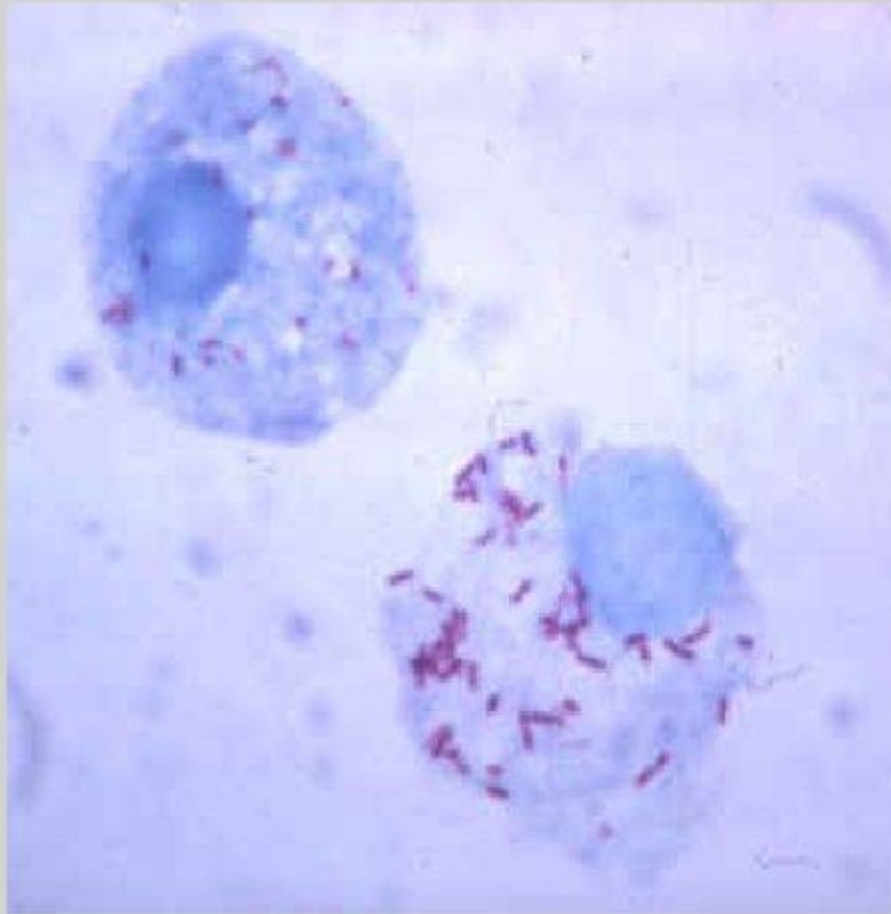
• перитрихи – по всей поверхности

– атрихи – жгутики отсутствуют

Спора и спорообразование у бактерий

- **Определение:** СПОРА - покоящаяся форма, позволяющая сохранить наследственную информацию бактериальной клетки в неблагоприятных условиях внешней среды
- **Функция** - защита от:
 - неблагоприятных физико-химических факторов внешней среды
 - истощения питательной среды
- **Строение** - ДНК, окруженная многослойной оболочкой, в т.ч. пептидогликановой (кортекс)

Особенности морфологии и ультраструктуры риккетсий



Морфология –
коккобактерии

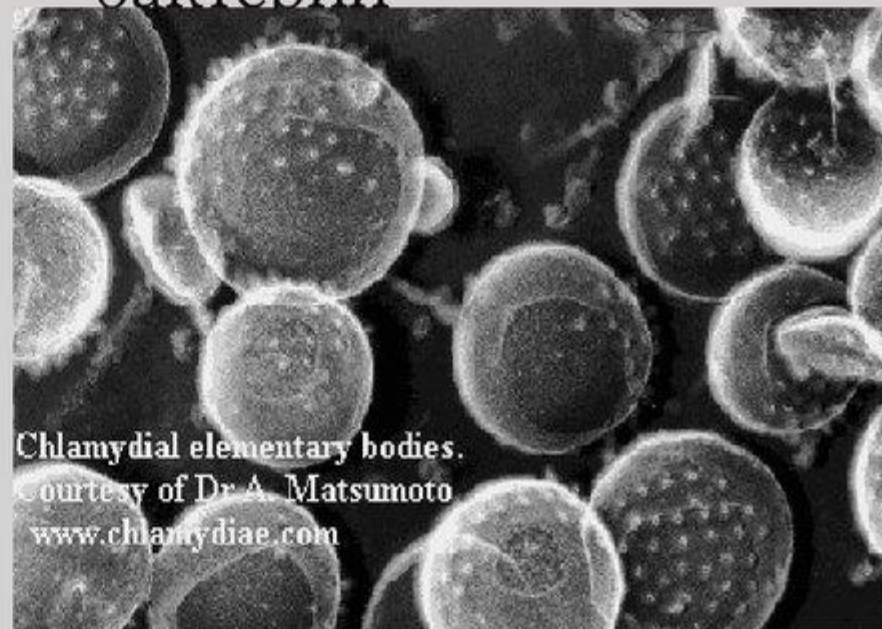
Принципиальное
отличие от других
прокариот - облигатные
внутриклеточные паразиты

Локализация в клетке-
хозяине - диффузно в
цитоплазме и/или ядре

Классификация и ультраструктура хламидий

- Тип: Chlamydiae
- Класс: Chlamydiae
- Род: Chlamydia
(C. psittaci,
C. trachomatis,
C. pneumoniae)

Ультраструктура –
типичная для
грамотрицательных
бактерий



Особенности морфологии хламидий

- **Морфология:**
- Вне клеток – элементарные тельца = спороподобные сферические клетки (являются инфекционной формой)
- В клетках – ретикулярные тельца = делящиеся формы, образуют микроколонии в клетках



- **Принципиальное отличие от других прокариот - облигатные внутриклеточные паразиты**

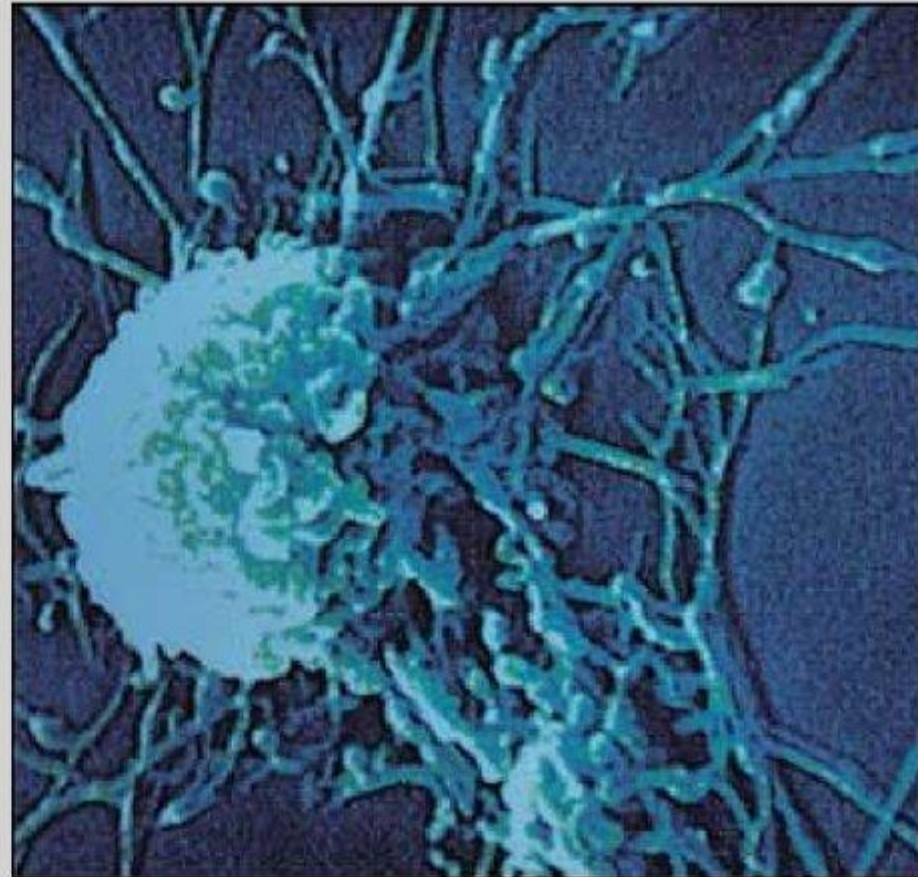
Локализация хламидий в клетке-хозяине

В виде цитоплазматических включений (микроколоний, окруженных общей оболочкой)



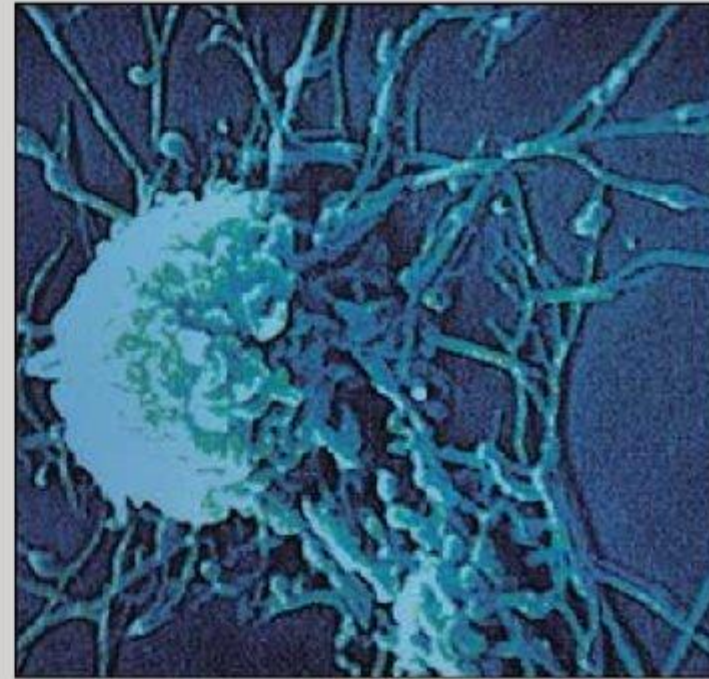
Классификация микоплазм

- Тип: Firmicutes
- Класс: Mollicutes
- Роды:
 - Mycoplasma
(*M.pneumoniae*)
 - Ureaplasma
(*U.urealyticum*)



Особенности морфологии и ультраструктуры микоплазм

- Полиморфные микроорганизмы,
- Покрываются трехслойной эластичной мембраной,
- В ЦПМ содержатся стерины,
- снаружи расположен капсулоподобный слой,
- Жгутиков не имеют, спор не образуют,
- Очень сильно отличаются по структуре ДНК



Принципиальные отличия от других прокариот:

- Нет КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ → нет определенной формы,

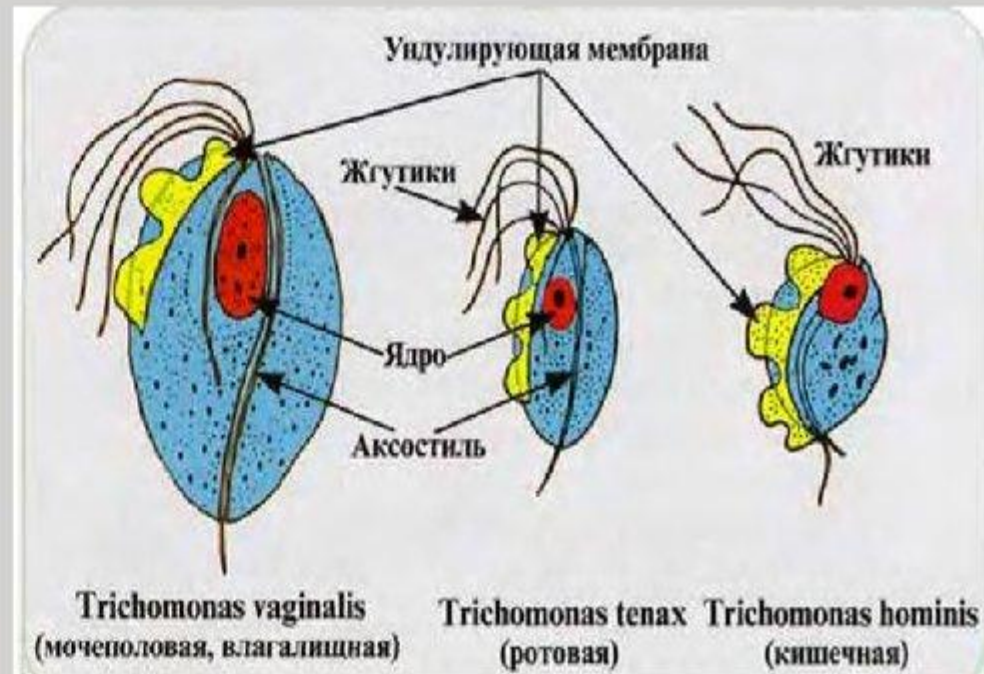
Патогенные простейшие: классификация

Царство: Animalia

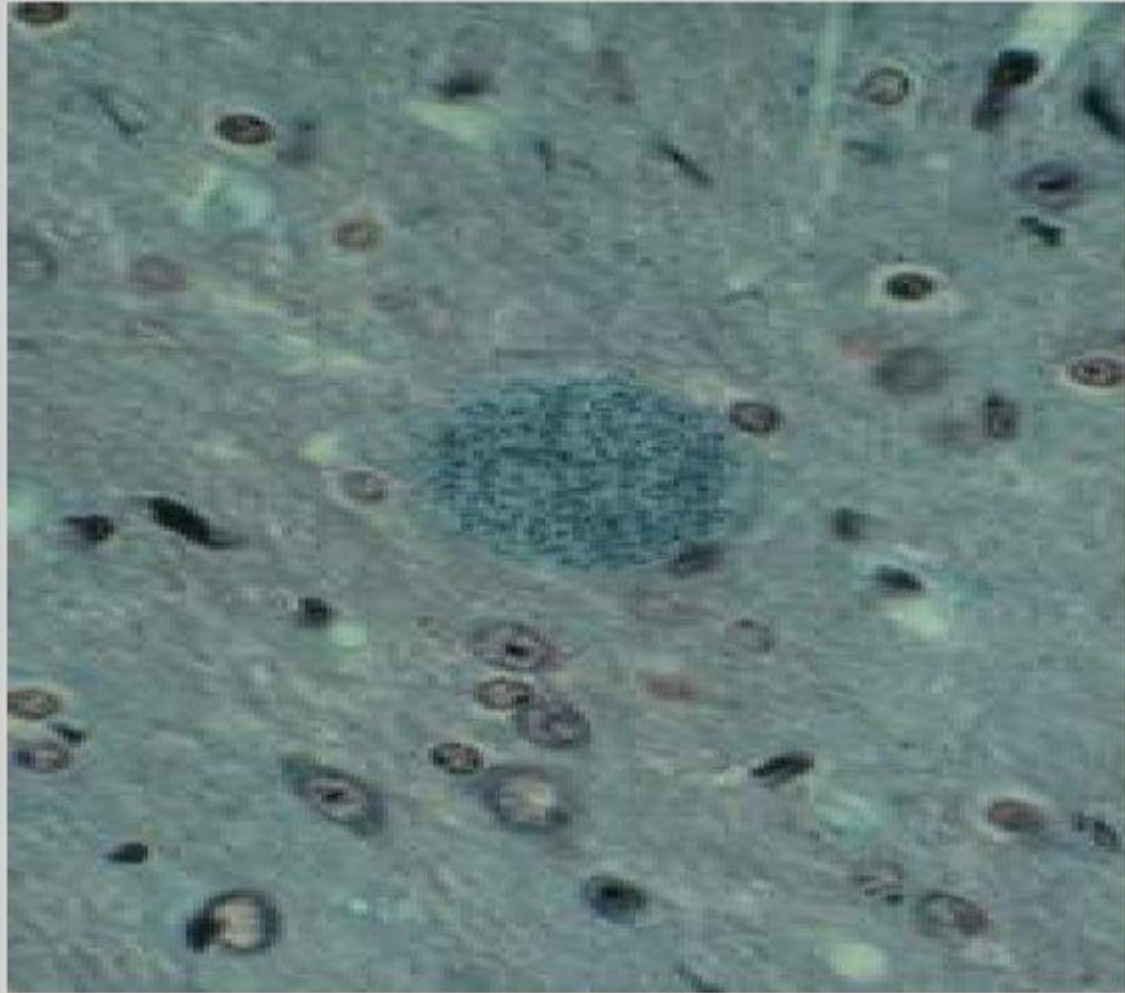
Подцарство: Protozoa

Типы:

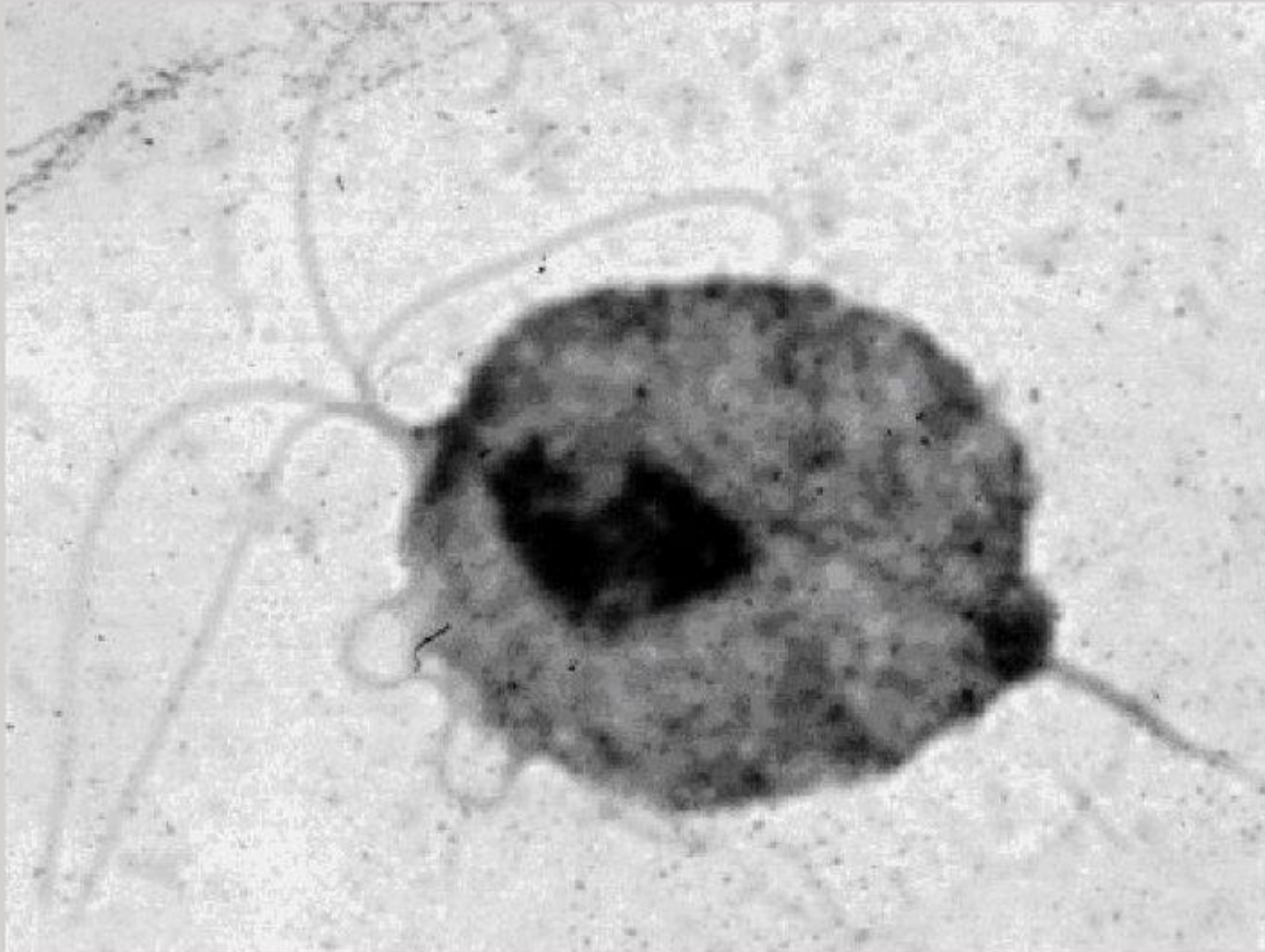
1. Sarcomastigophorae
2. Apicomplexa
3. Ciliophora
4. Microspora



Toxoplasma gondii



Trichomonas vaginalis



- В нативном (естественном) состоянии бактерии имеют такой же коэффициент преломления, как и стекло, поэтому они невидимы при микроскопическом исследовании.
- Окраска микроорганизмов позволяет изучить морфологические особенности микробов

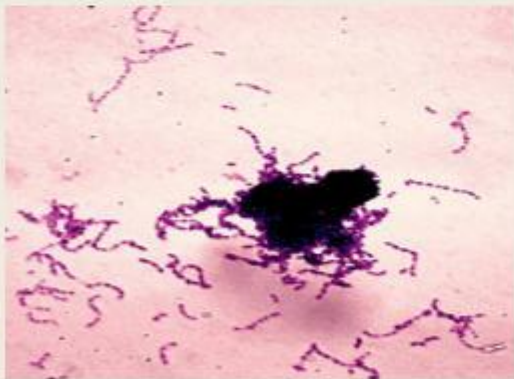
Основные виды красителей, которые применяются в микробиологической практике:

Дают следующее окрашивание				
красное	голубое (синее)	фиолетовое	желто-коричневое	зеленое
фуксин основной, нейтральный красный, конго красный	метиленовый и толуидиновый синий	генцианвиолет, метиленовый фиолетовый	хризоидин везувин	бриллиантовый зеленый, малахитовый зеленый

Методы окраски

Простой метод

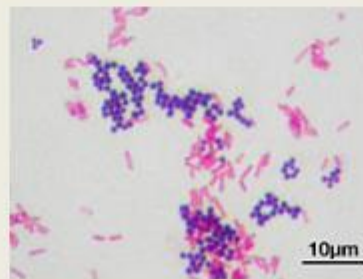
- ❑ 1 этап
- ❑ 1 краситель
- ❑ Можно оценить форму, размеры и взаимное расположение клеток



Стрептококки - это кокки, расположенные цепочками

Сложные методы

- ❑ Несколько этапов
- ❑ 2 красителя
- ❑ Протравы
- ❑ Дифференцирующие вещества
- ❑ Позволяют отличить одну группу бактерий от другой или выявить определенные структуры бактериальной клетки



Грамположительные (фиолетовые) кокки и грамотрицательные (красные) палочки

Методы окраски

- ❑ **Протравы** – физические и химические факторы, обладающие свойствами повышать окрашиваемость микробов. Уплотняя цитоплазму, они могут делать окраску более прочной, или усиливать красящие свойства красителя, или разрыхлять оболочки клеток, спор, способствуя проникновению краски в клетку.
 - Протравами обрабатывают мазок:
 - а) перед окрашиванием – воздействуя раствором HCl при окраске спор у бактерий в методе Ожешки,
 - б) в момент окраски – фенол и высокая температура (подогревание препарата) в методе Циля-Нильсена;
 - в) после нанесения краски для ее закрепления – раствор Люголя в методе Грама.

- ❑ **Дифференцирующие вещества** избирательно обесцвечивают одни виды или структуры бактериальных клеток и не обесцвечивают другие. Например: этиловый спирт в окраске по Граму, серная кислота в методах Циля-Нильсена и Ожешки.

Техника приготовления фиксированного мазка

- ❑ **Фиксированный мазок** – основа большинства методов окраски
- ❑ На обезжиренное предметное стекло наносят бактериальной петлей маленькую каплю исследуемой жидкости; воды или стерильного физиологического раствора и бактериологической петлей переносят в нее небольшое количество исследуемого материала.
- ❑ Полученную суспензию равномерно распределяют тонким слоем на площади 1 - 2 см петлей.
- ❑ Препарат высушивают при комнатной температуре на воздухе. Для ускорения высушивания допускается подогревание мазка в струе теплого воздуха высоко над пламенем горелки.
- ❑ Высушенный мазок фиксируют в пламени горелки.
- ❑ **Фиксация** мазка является обязательной процедурой, в результате которой микробы погибают, прочно прикрепляются к стеклу и значительно лучше воспринимают окраску.



Техника приготовления фиксированного мазка. Простой метод окраски

- **Способы фиксации:**
 - обычно применяют фиксацию в пламени горелки (фиксация жаром): предметное стекло в положении мазком вверх 3 раза проводят через пламя горелки.
 - применяют также различные жидкие фиксаторы, оказывающие более щадящее действие, например: этиловый или метиловый спирт, ацетон, формалин и др. Существуют также жидкие фиксаторы, представляющие собой смесь нескольких веществ, например, по Никифорову (смесь этилового спирта и эфира 1:1).
 - Выбор способа фиксации зависит от окрашиваемого объекта: в жидких фиксаторах фиксируют мазки из крови, гноя, мокроты и т.п. и метода окраски.



Сложные методы окраски

Дифференциальные

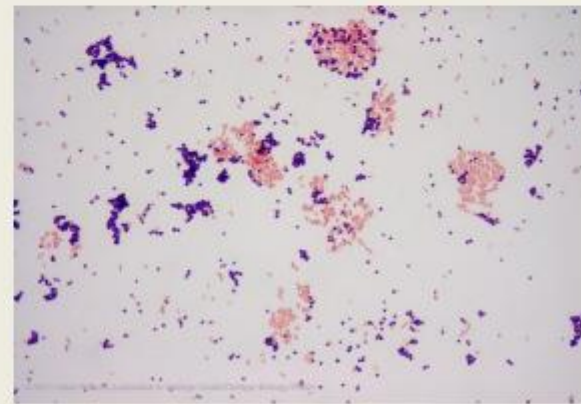
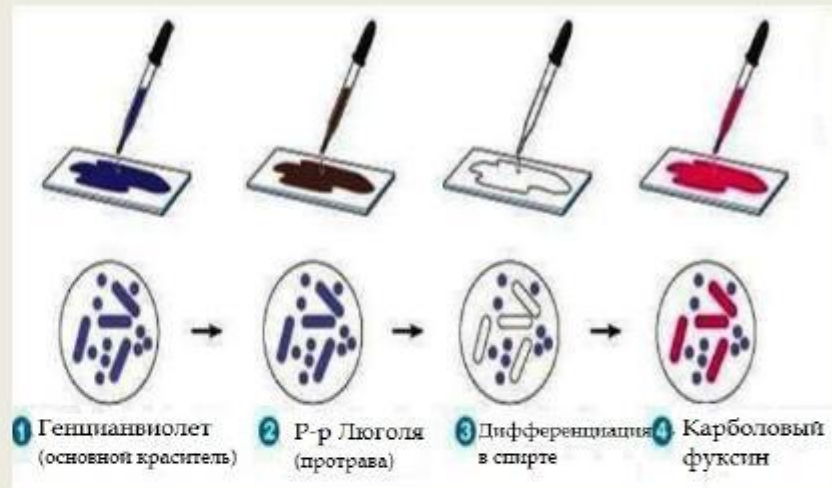
- ❑ Метод Грама – дифференцирует грамположительные и грамотрицательные бактерии – важный таксономический признак
- ❑ Метод Циля-Нильсена – дифференцирует кислотоустойчивые и некислотоустойчивые бактерии – принципиальное значение в диагностике туберкулеза

Выявляющие структуры бактериальной клетки

- ❑ Метод Ожешко – споры
- ❑ Метод Бурри-Гинса – капсула
- ❑ Метод Нейссера – включения волютина
- ❑ Метод Пешкова – клеточная стенка
- ❑ Метод Романовского-Гимзы – **универсальный** – окраска нуклеоида, риккетсий, хламидий, спирохет

Метод Грама

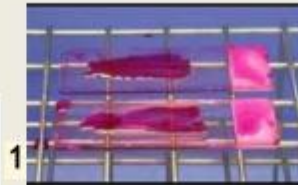
цель метода	Выявление грамположительных и грамотрицательных бактерий
основной краситель	карболовый раствор генцианвиолета
протрава	раствор Люголя (после окрашивания)
дифференцирующее вещество	этанол
дополнительный краситель	разбавленный карболовый раствор фуксина
способ фиксации препарата-мазка	в пламени спиртовки до окрашивания
этапы окраски	Окрасить раствором генцианвиолета 1 мин. (или с бумажкой – 3 мин.); Нанести на мазок раствор Люголя – 1 мин.; Промыть в этаноле 30 сек.; Промыть водой; Окрасить раствором фуксина 1 мин. (или с бумажкой – 5 мин.); Промыть водой; Высушить
сущность метода	Генцианвиолет образует комплекс с тейхоевыми кислотами в присутствии Люголя, который задерживается многослойным пептидогликаном у грамположительных бактерий



Грамположительные –Staphylococcus- фиолетовые;
Грамотрицательные–E.coli-красные

Метод Циля-Нильсена

цель метода	Выявление кислотоустойчивых и некислотоустойчивых бактерий
основной краситель	карболовый раствор фуксина
протрава	карболовая кислота (в момент окрашивания)
дифференцирующее вещество	серная кислота
дополнительный краситель	водный раствор метиленового синего
способ фиксации препарата-мазка	в пламени спиртовки в процессе окраски
этапы окраски	Окрашивать карболовым раствором фуксина (фуксин Циля) через фильтровальную бумажку при осторожном нагревании над пламенем спиртовки 3 раза до появления паров белого цвета (1); Промыть в 5% серной кислоте; Промыть водой; Окрасить раствором метиленового синего 1 мин.; Промыть водой; Высушить
сущность метода	При частичном гидролизе клеточной стенки фуксин взаимодействует с миколовыми кислотами и образует комплекс в присутствии фенола



1



2 дифференциация в серной кислоте 20 сек.



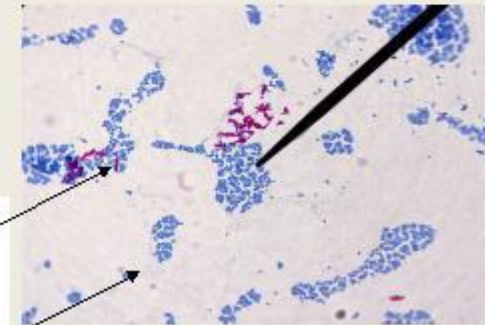
3 Промывка водой



4 окрашивание метиленовым синим

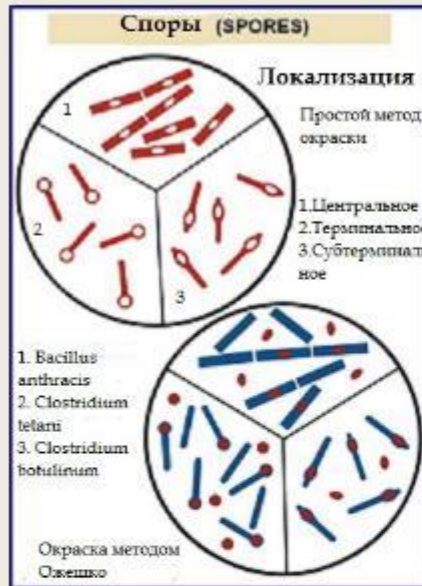


5 Промывка водой



Кислотоустойчивые –
Mycobacterium-
красные;
некислотоустойчивые –
Staphylococcus-синие

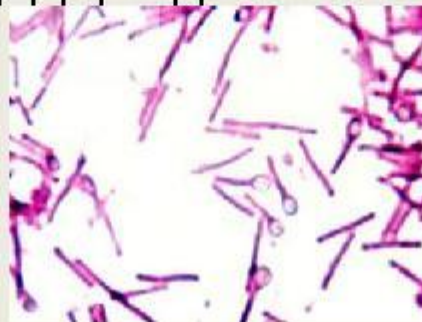
Методы выявления спор



- При простом способе окраски спора не прокрашивается – в этом случае видны только эндоспоры как бесцветные образования в клетке
- Эндоспоры в теле клетки может располагаться:
 - 1. центрально — возбудитель сибирской язвы *Bacillus anthracis*;
 - 2. терминально — на конце палочки (возбудитель столбняка *Clostridium Tetani*);
 - 3. субтерминально — ближе к концу (возбудитель ботулизма, *Clostridium botulinum*).
- Способность бактерий образовывать споры, различающиеся по форме размерам и локализации в клетке, является таксономическим признаком, который используется для их дифференцировки



1. *Bacillus anthracis*



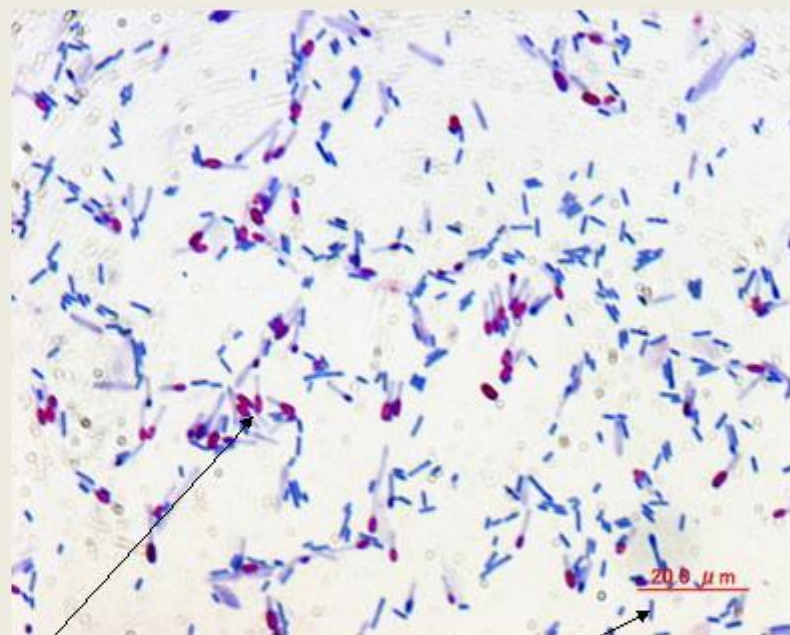
2. *Clostridium Tetani*



3. *Clostridium Botulinum*

Методы выявления спор. Метод Ожешко

цель метода	Выявление спор у бактерий
основной краситель	фуксин Циля
протрава	соляная кислота (до окрашивания), карболовая кислота (в момент окрашивания)
дифференцирующее вещество	серная кислота
дополнительный краситель	водный раствор метиленового синего
способ фиксации препарата-мазка	в пламени спиртовки в процессе окраски
этапы окраски	На высушенный мазок наложить фильтровальную бумажку, налить 0,5% раствор соляной кислоты и нагревать над пламенем спиртовки до появления пара 3 раза; Далее окрашивать по Цилю-Нильсену.
сущность метода	Внутренние оболочки споры содержат большое количество липидов, которые придают ей свойство кислотоустойчивости

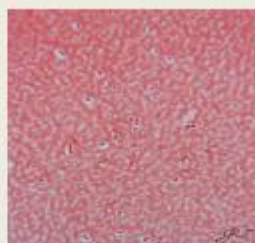


Споры малиновые, видны как эндоспоры внутри вегетативных клеток, так и отдельные споры

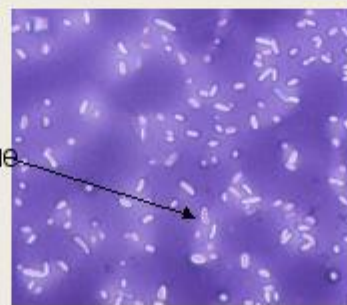
Вегетативные клетки синие

Методы выявления капсул

	метод Бурри-Гинса (цитохимический)
цель метода	Выявление капсулы у бактерий в чистой культуре
основной краситель	не окрашивается, применяется оттеняющее вещество - тушь
протрава	-
дифференцирующее вещество	-
дополнительный краситель	карболовый раствор фуксина
способ фиксации препарата-мазка	в пламени спиртовки (в этаноле) до окрашивания
этапы окраски	В каплю туши добавить каплю жидкости с микроорганизмами и растереть тонким слоем как мазок крови; Высушить и зафиксировать; Окрасить фуксином Цилия 1 мин.; Высушить
сущность метода	Капсула не окрашивается, задерживает тушь на поверхности, а фуксин окрашивает бактериальную клетку



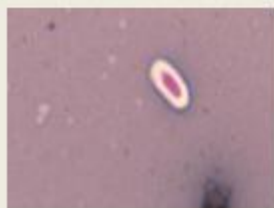
Str.pneumoniae
Простой метод (фуксин)



- Капсулы имеют консистенцию геля, плохо удерживают краситель, и для их выявления чаще всего применяют методы негативного контрастирования
- Капсула выявляется при любом методе окраски в виде неокрашенной зоны между окрашенными телом бактерий и субстратом.
- При простом методе и методе Грама достаточно не промывать мазок на последнем этапе окраски



Грамположительные палочки рода Bacillus
Окраска по Граму



Метод Бурри-Гинса: на фоне туши и видны красные палочки, окруженные бесцветной капсулой

Включения волютина

	метод Нейссера (цитохимический)
цель метода	Выявление включений - зёрен волютина
основной краситель	раствор уксуснокислой синьки
протрава	раствор Люголя
дифференцирующее вещество	-
дополнительный краситель	раствор везуина
способ фиксации препарата-мазка	в пламени спиртовки до окрашивания
этапы окраски	Окрасить уксуснокислой синькой 1 мин.; Промыть водой; Обработать раствором Люголя 30 сек.; Окрасить везуином 30 сек.; Промыть водой Высушить
сущность метода	Включения волютина содержат полифосфаты и имеют слабощелочной pH и окрашиваются синькой, которая закрепляется Люголем, цитоплазма имеет кислый pH и окрашивается везуином

Включения волютина постоянно имеют возбудитель дифтерии - *Corynebacterium diphtheriae*, дрожжеподобные грибы рода *Candida*, что является таксономическим признаком

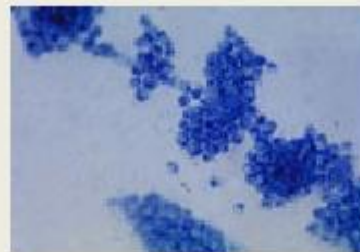
Метод Леффлера (простой метод)

□ Для окраски используют щелочной р-р метиленового синего, который наносят на 3 - 5 мин на фиксированный мазок, после чего смывают водой, мазок высушивают и микроскопируют.

□ Протоплазма бактерий окрашивается в голубой цвет, волютиновые зерна - в темносиний.

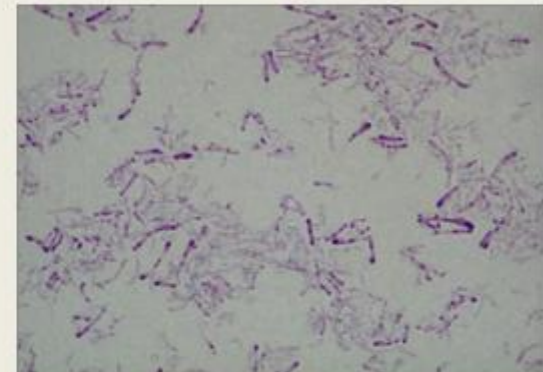


C. diphtheriae окраска по Нейссеру



Candida albicans
окраска по

Леффлеру: в голубой



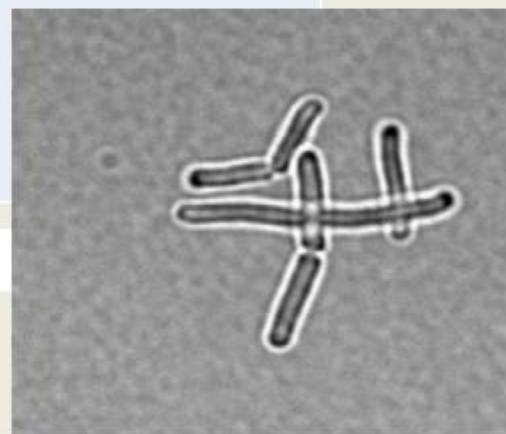
C. diphtheriae окраска по
Леффлеру: на полюсах

палочек утолщения - зерна

Окраска клеточной стенки по Пешкову

	метод Пешкова (цитохимический)
цель метода	Выявление клеточной стенки бактерий
основной краситель	водный раствор фуксина
протрава	раствор танина
дифференцирующее вещество	-
дополнительный краситель	-
способ фиксации препарата-мазка	в жидкости Карнуа 15 мин. перед окрашиванием и промывают водой
этапы окраски	Мазок протравливать в 10% водном растворе танина 6-8 мин.; Промыть водой; Окрашивать в одним раствором фуксина 30-60 сек; Высушить
сущность метода	Танин уплотняет клеточную стенку бактерий, и большая часть фуксина задерживается в ней
микроскопическая картина (рисунок с пояснением)	КС –красная; цитоплазма –розовая

Vacillus cereus окраска по Пешкову: клеточная стенка окрашивается более интенсивно



Окраска нуклеоида по Романовскому-Гимзе

	метод Романовского-Гимзы (универсальный)
цель метода	Дифференциальное окрашивание отдельных групп м/о и выявление нуклеоида
основной краситель	краситель Романовского-Гимзы (азур, эозин, метиленовый синий)
протрава	соляная кислота
дифференцирующее вещество	-
дополнительный краситель	-
способ фиксации препарата-мазка	в жидкости Карнуа 15 мин. перед окрашиванием
этапы окраски	Провести кислотный гидролиз в растворе соляной кислоты при нагревании; Промыть водой; Окрашивают краской Романовского-Гимзы 40-60 мин.; Промыть водой; Высушить
сущность метода	Азур и метиленовый синий окрашивают участки клетки со слабощелочным рН, эозин с кислым



- ❑ *Bacillus cereus* окраска по Романовскому-Гимзе: цитоплазма розовая, нуклеоиды – фиолетовые
- ❑ Поскольку деление цитоплазмы происходит несинхронно с репликацией, в растущей культуре в одной клетке видны несколько нуклеоидов.

Спасибо за внимание