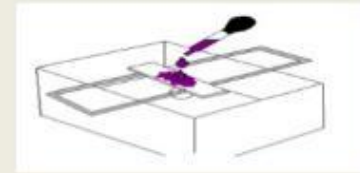


Морфология микроорганизмов. Методы окраски.

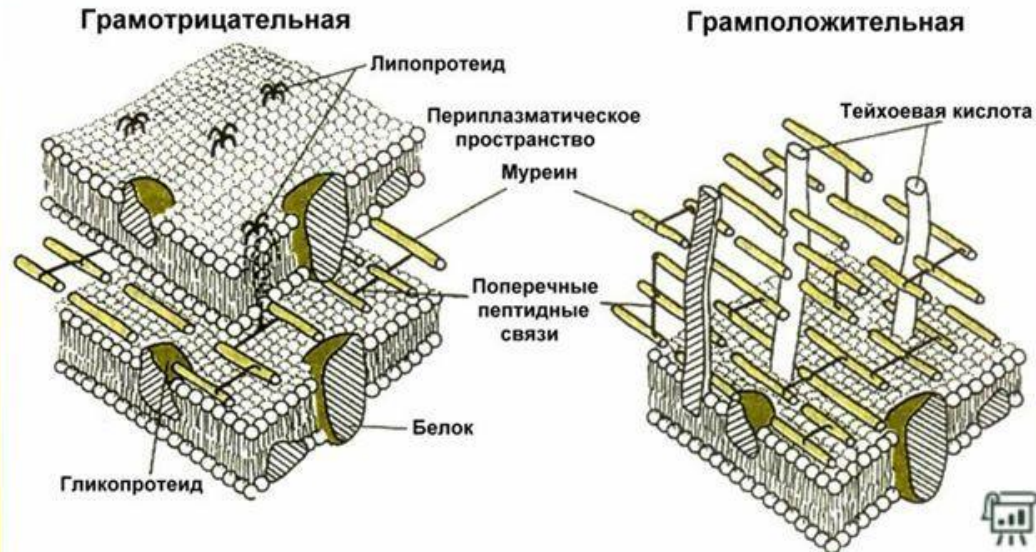


Строение бактерий

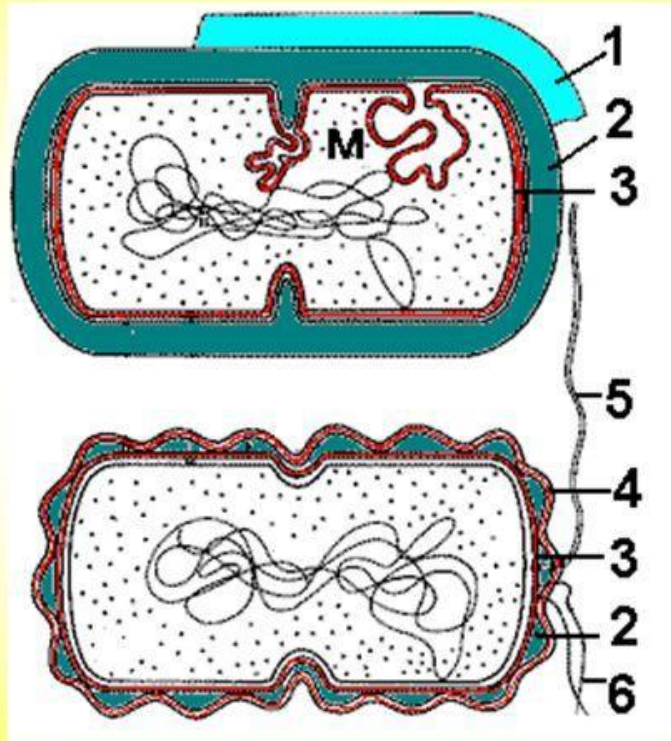
Клеточная стенка

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**.

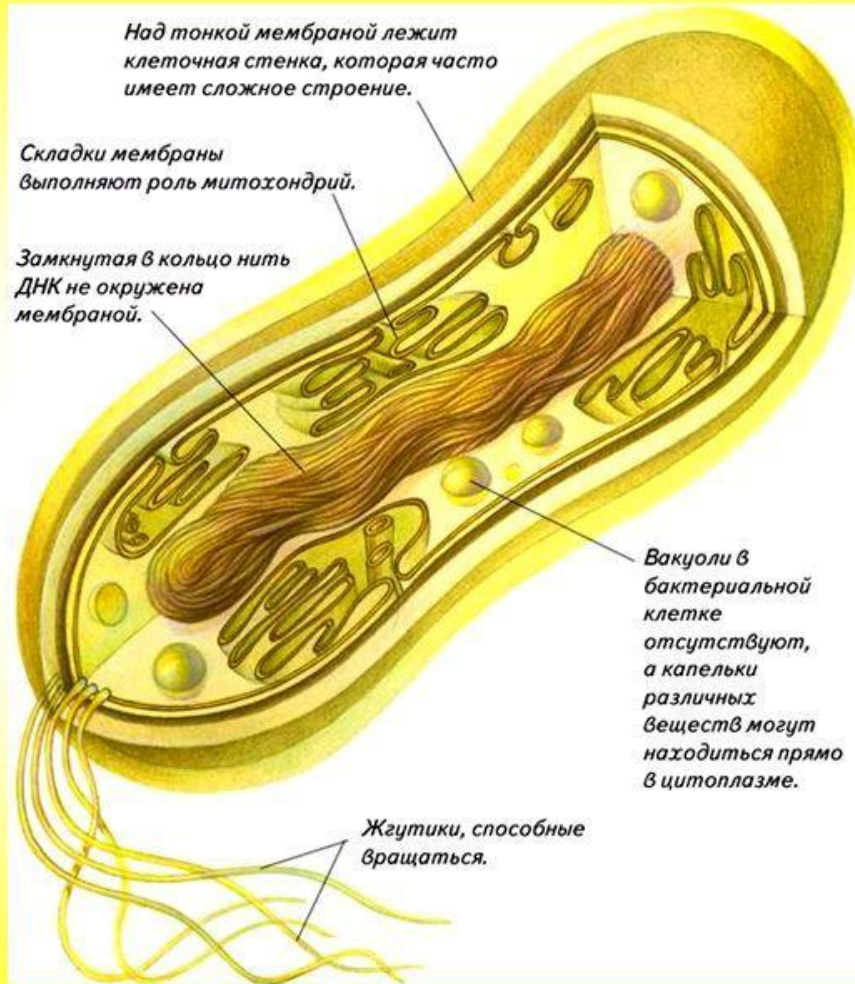


Строение бактерий



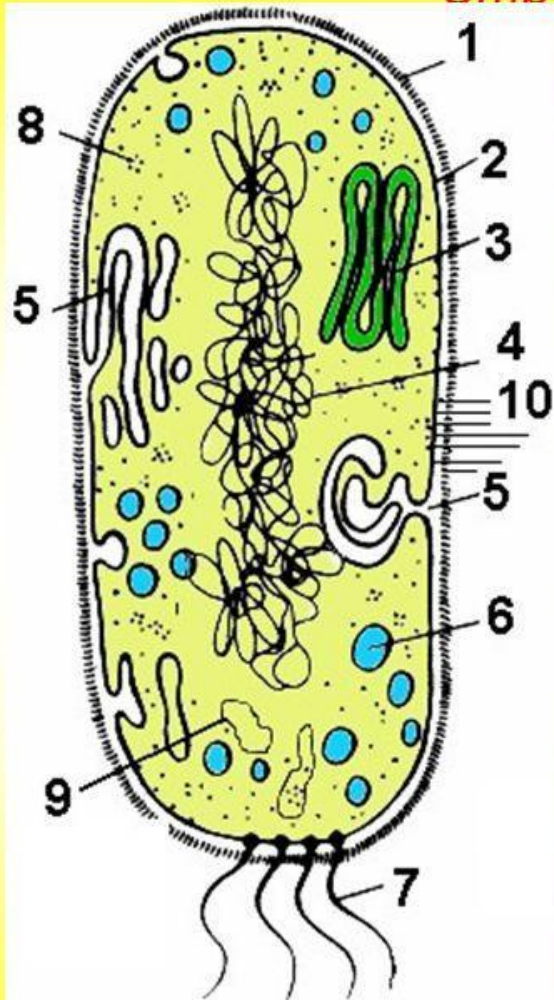
У многих бактерий поверх клеточной стенки располагается слизистый матрикс — **капсула**. Капсулы образованы полисахаридами. Иногда в состав капсулы входят полипептиды. Как правило, капсула выполняет защитную функцию, предохраняя клетку от действия неблагоприятных факторов среды. Кроме того, она может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

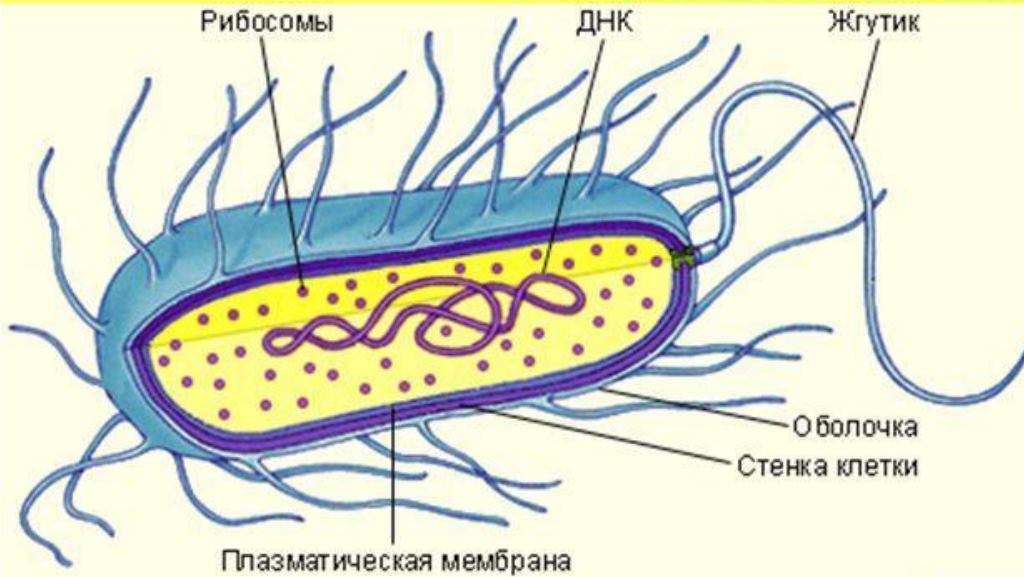
Строение бактерий



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

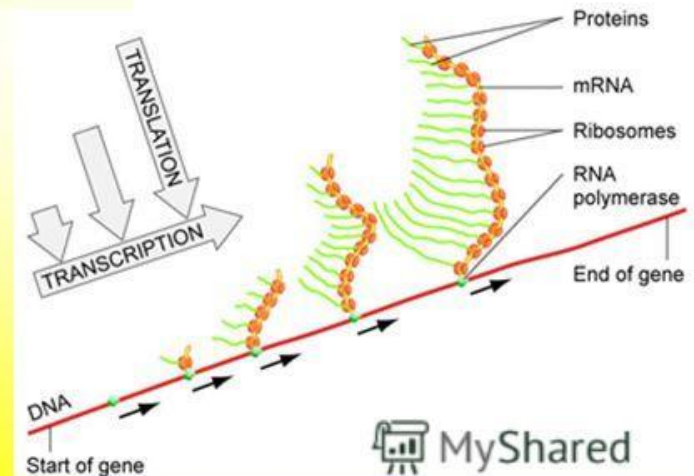


Строение бактерий



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

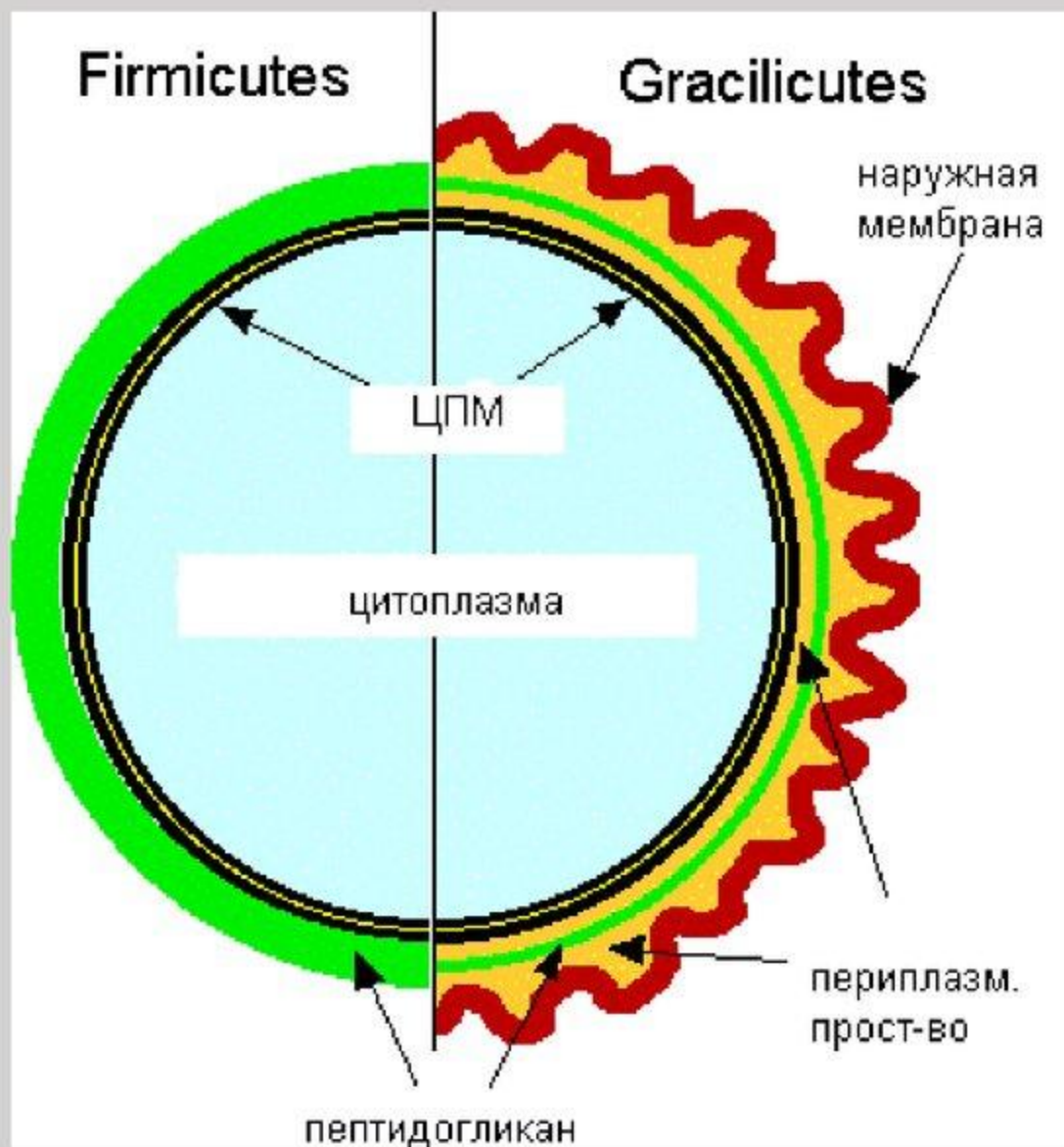
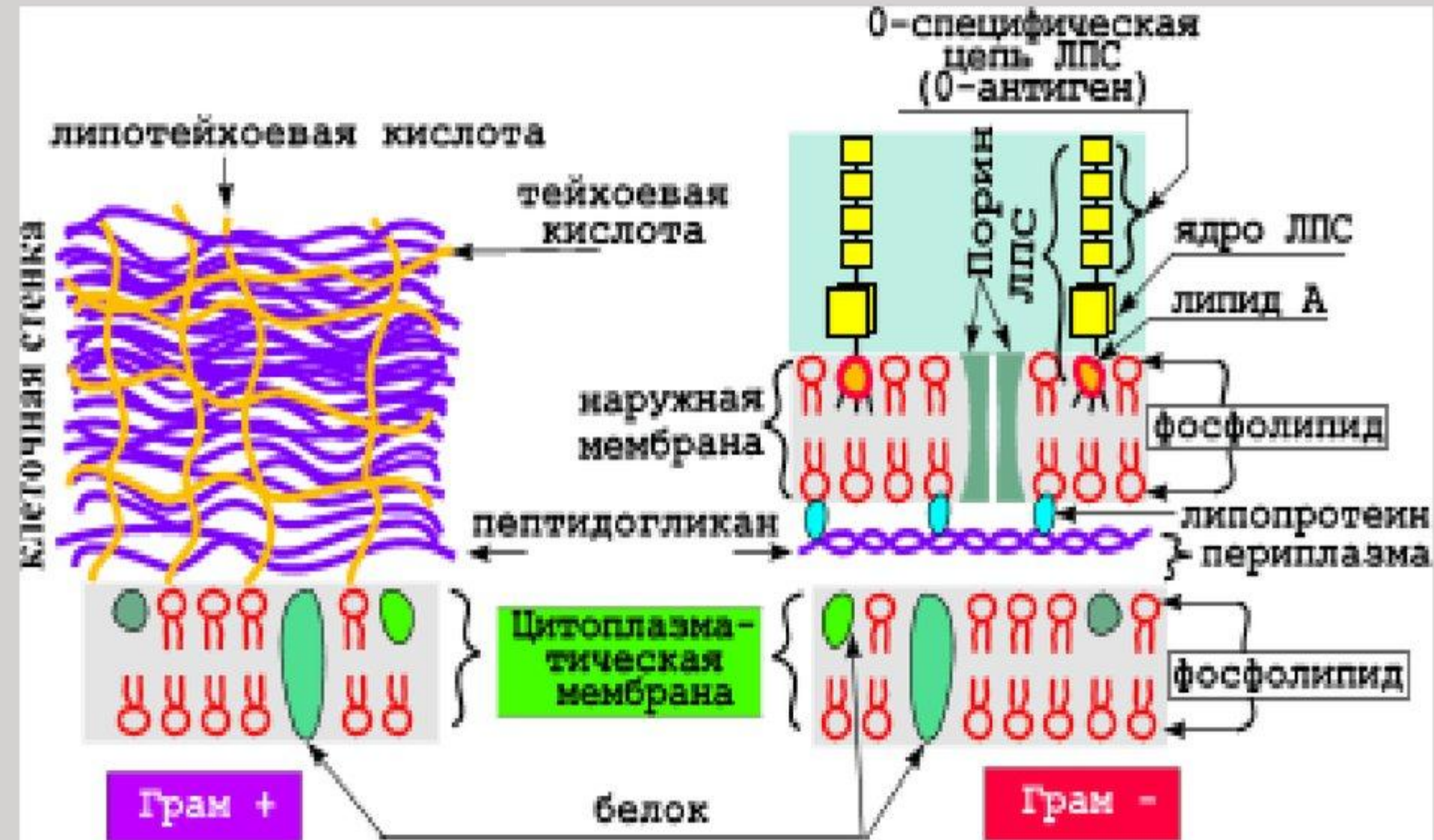


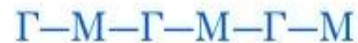
Схема строения оболочек

грамположительных и грамотрицательных бактерий

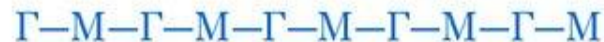


Строение пептидогликана грамположительных бактерий

- **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 грамотрицательных 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



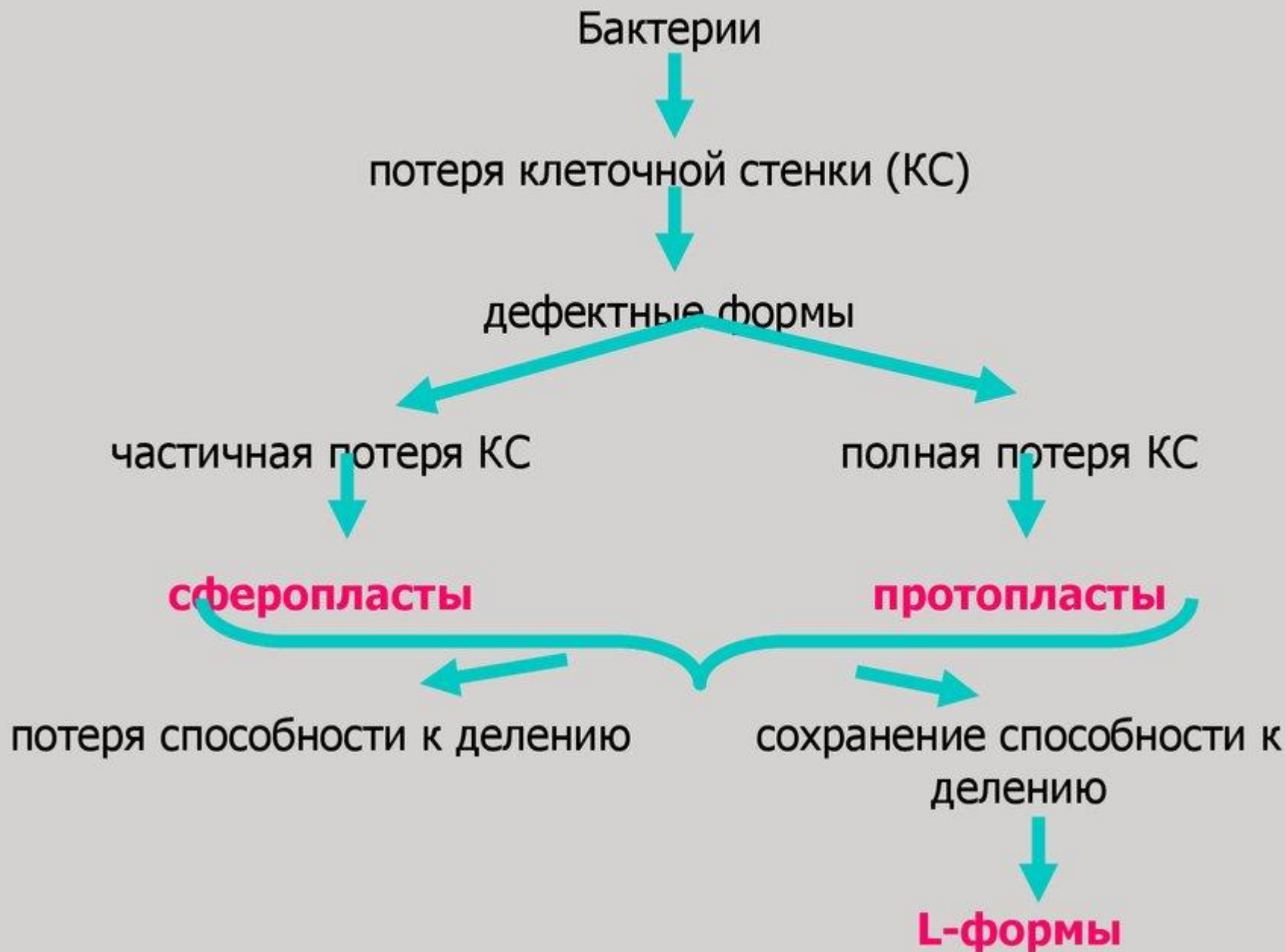
Строение наружной мембраны грамотрицательных бактерий

- **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



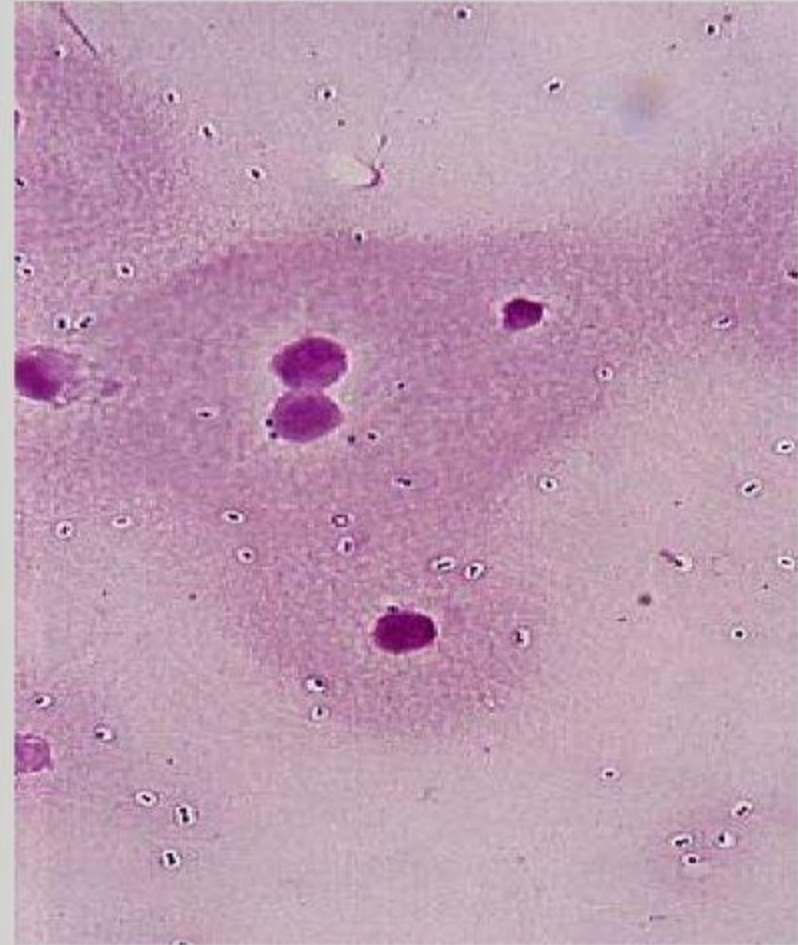
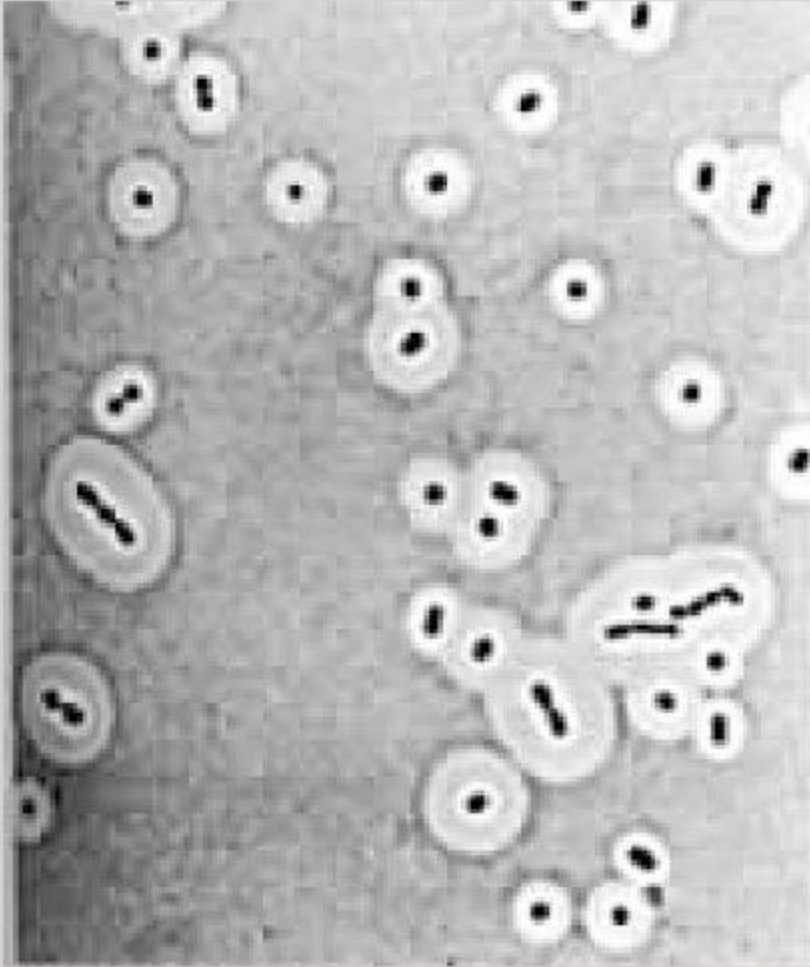
Микро- и макрокапсула бактерий

| | 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 | |

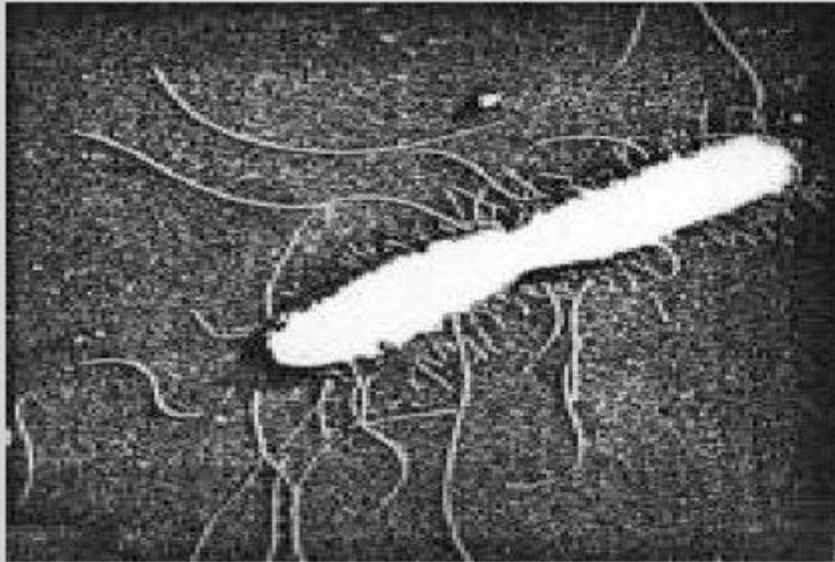
Микро- и макрокапсула бактерий

| | Макрокапсула (капсула) | Микрокапсула |
|-------------------------------|---|--|
| Бактерии, обладающие капсулой | <p>Особенно выражена у:</p> <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 |

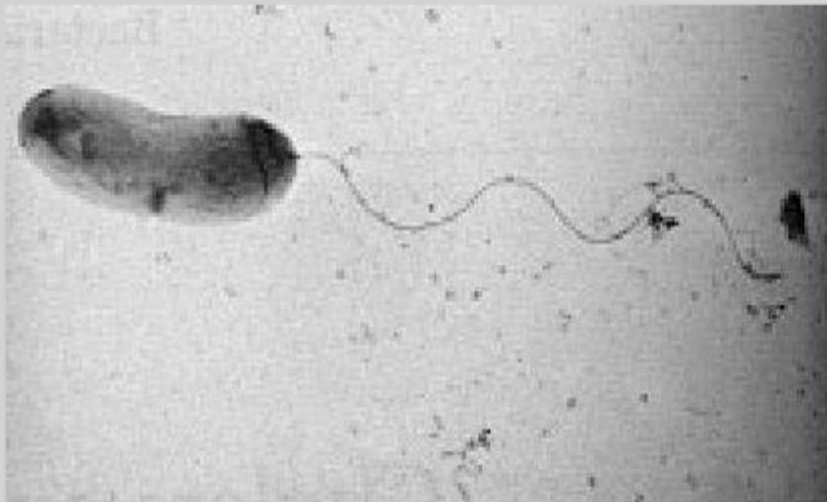
Капсула бактерий



Жгутики бактерий



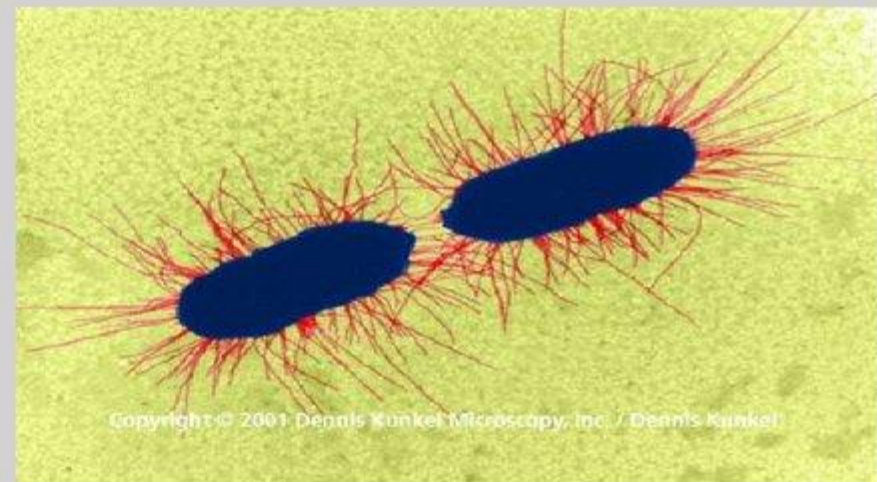
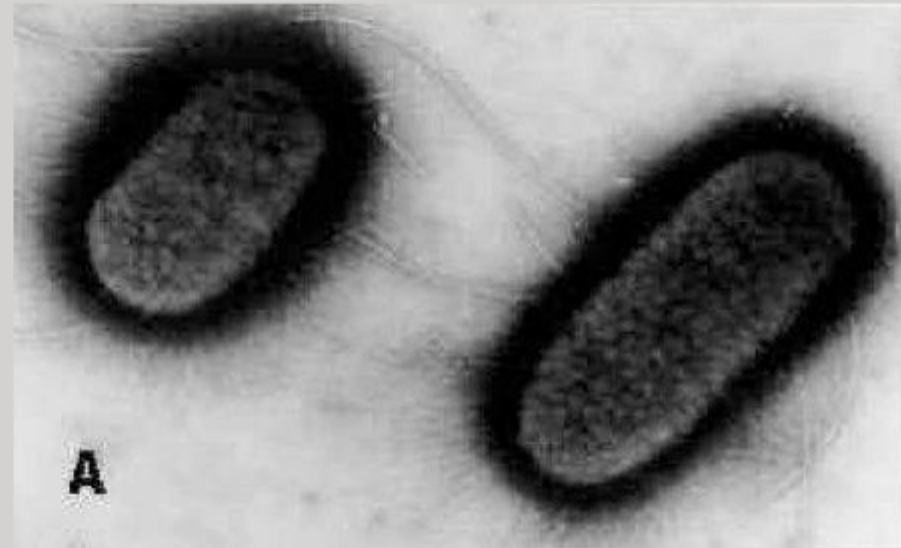
- Органы движения бактерий
 - жгутики
 - осевая нить (у спирохет)



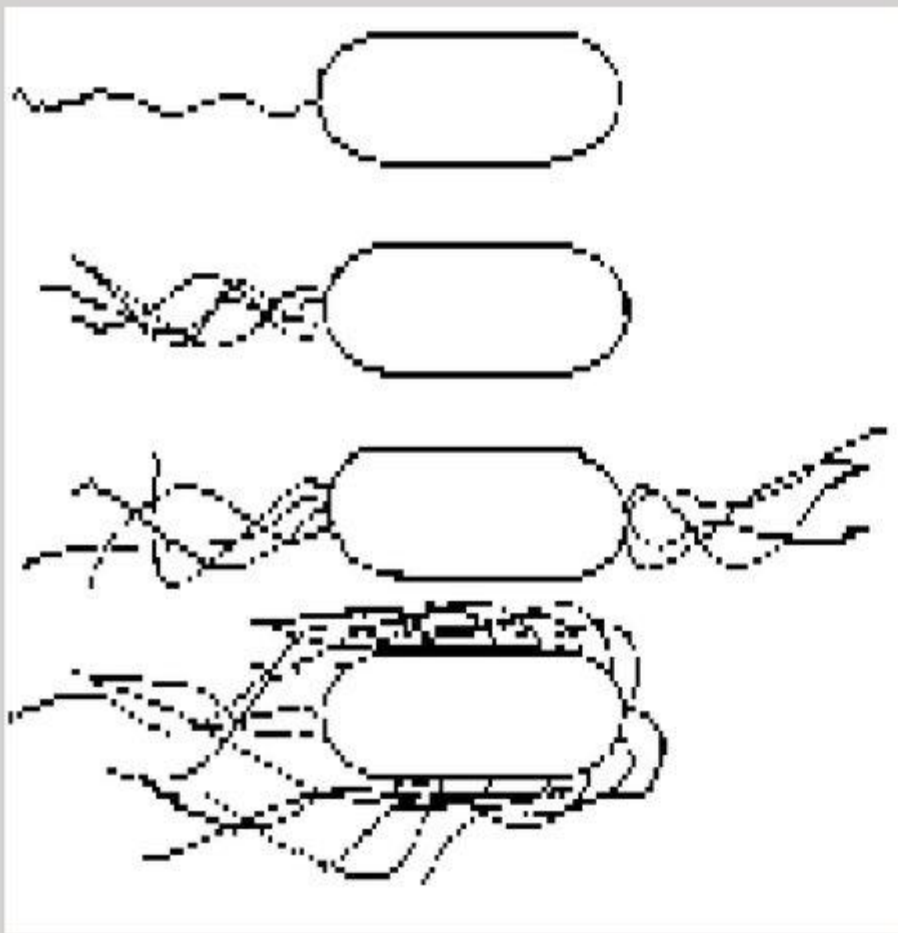
- Тип движения жгутиков
 - Вращательный

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

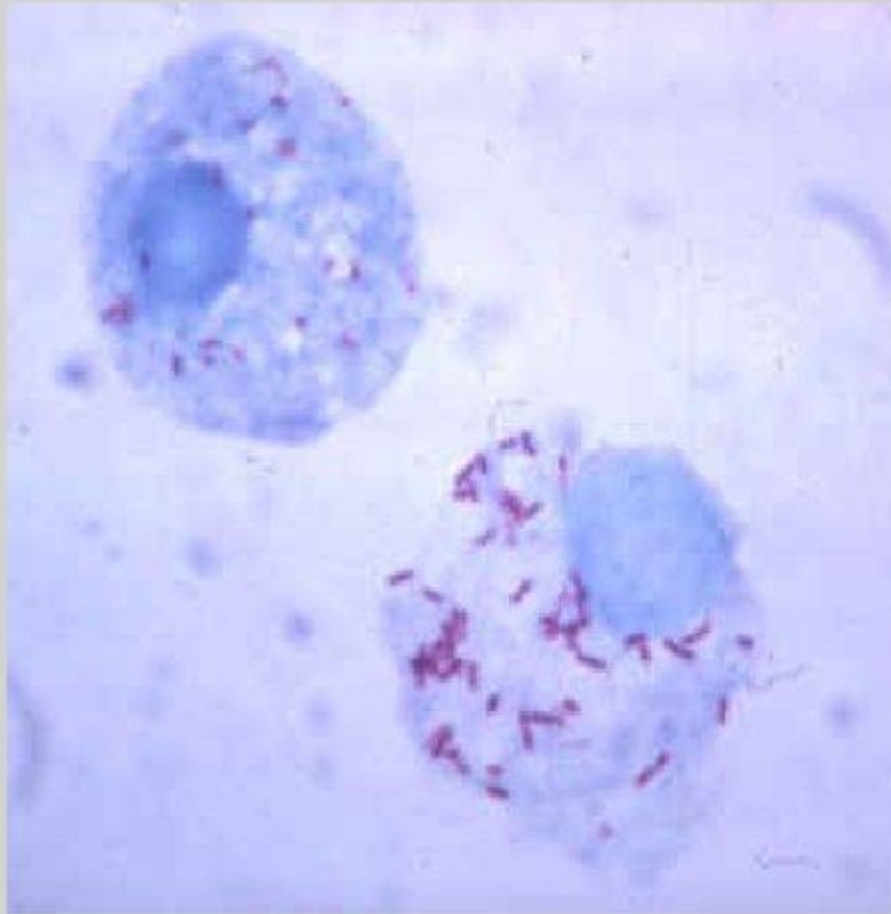
• перитрихи – по всей поверхности

– 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

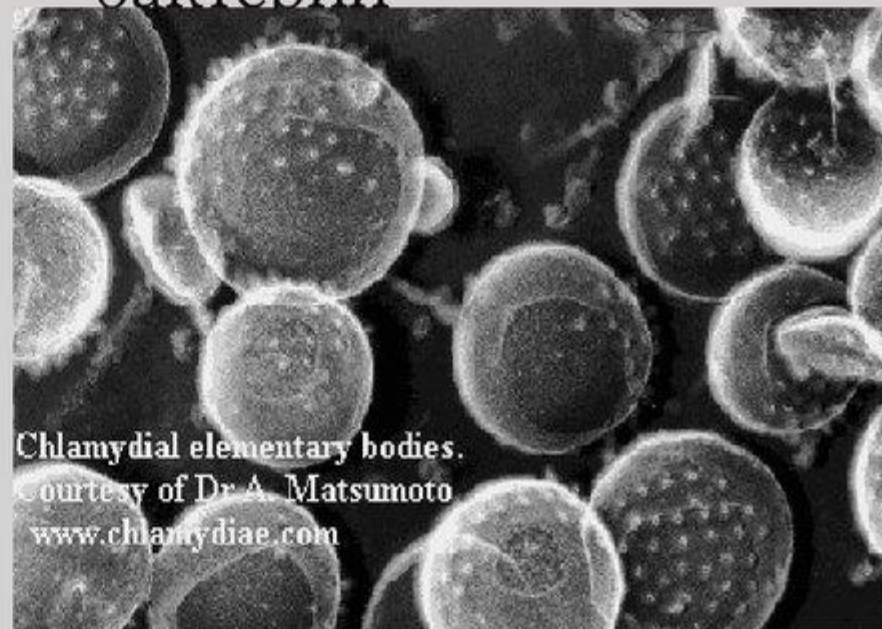
Принципиальное
отличие от других
прокариот - облигатные
внутриклеточные паразиты

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**

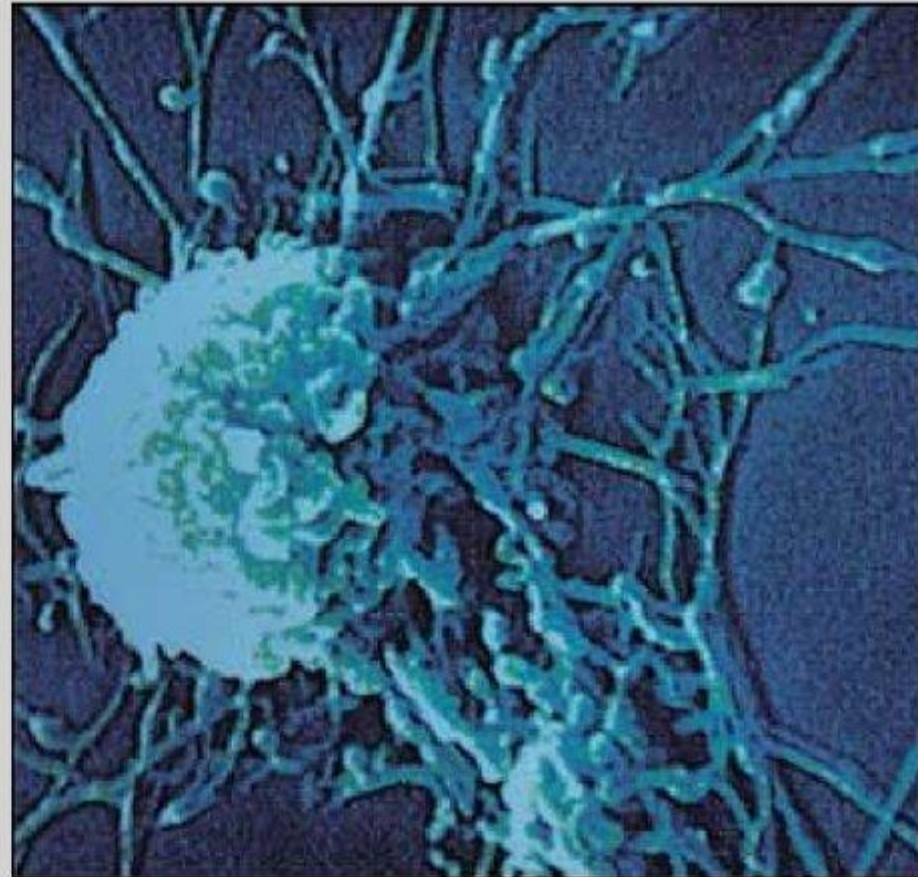
Локализация хламидий в клетке-хозяине

В виде цитоплазматических включений (микроколоний, окруженных общей оболочкой)



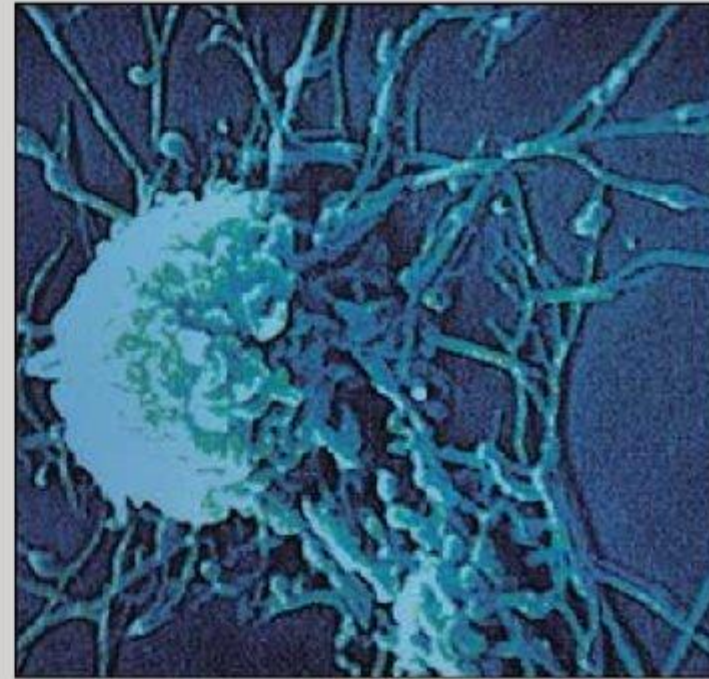
Классификация микоплазм

- 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,

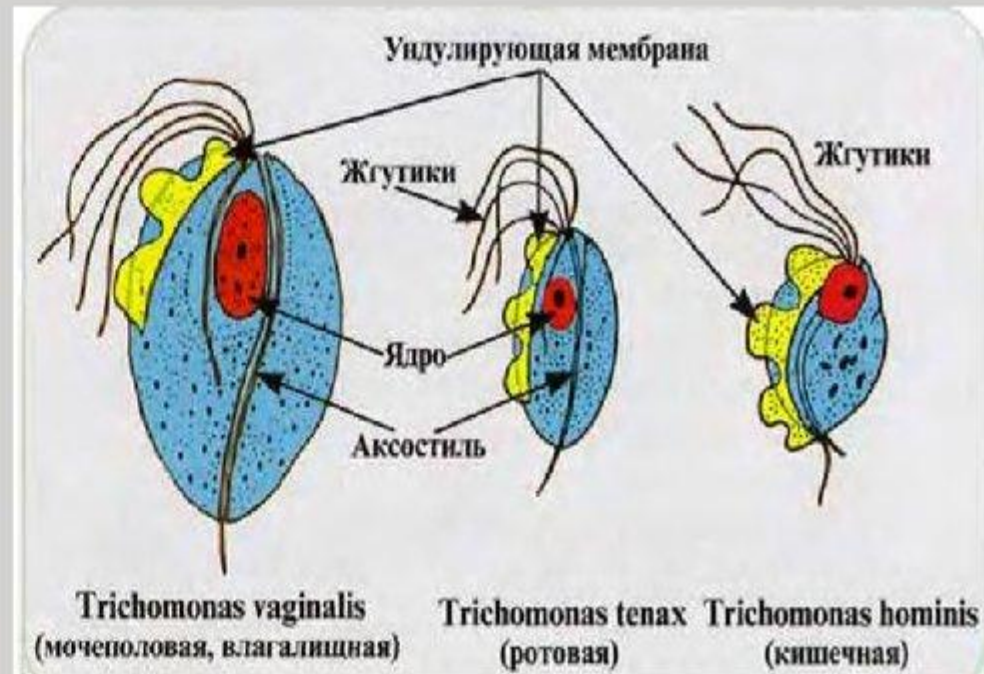
Патогенные простейшие: классификация

Царство: Animalia

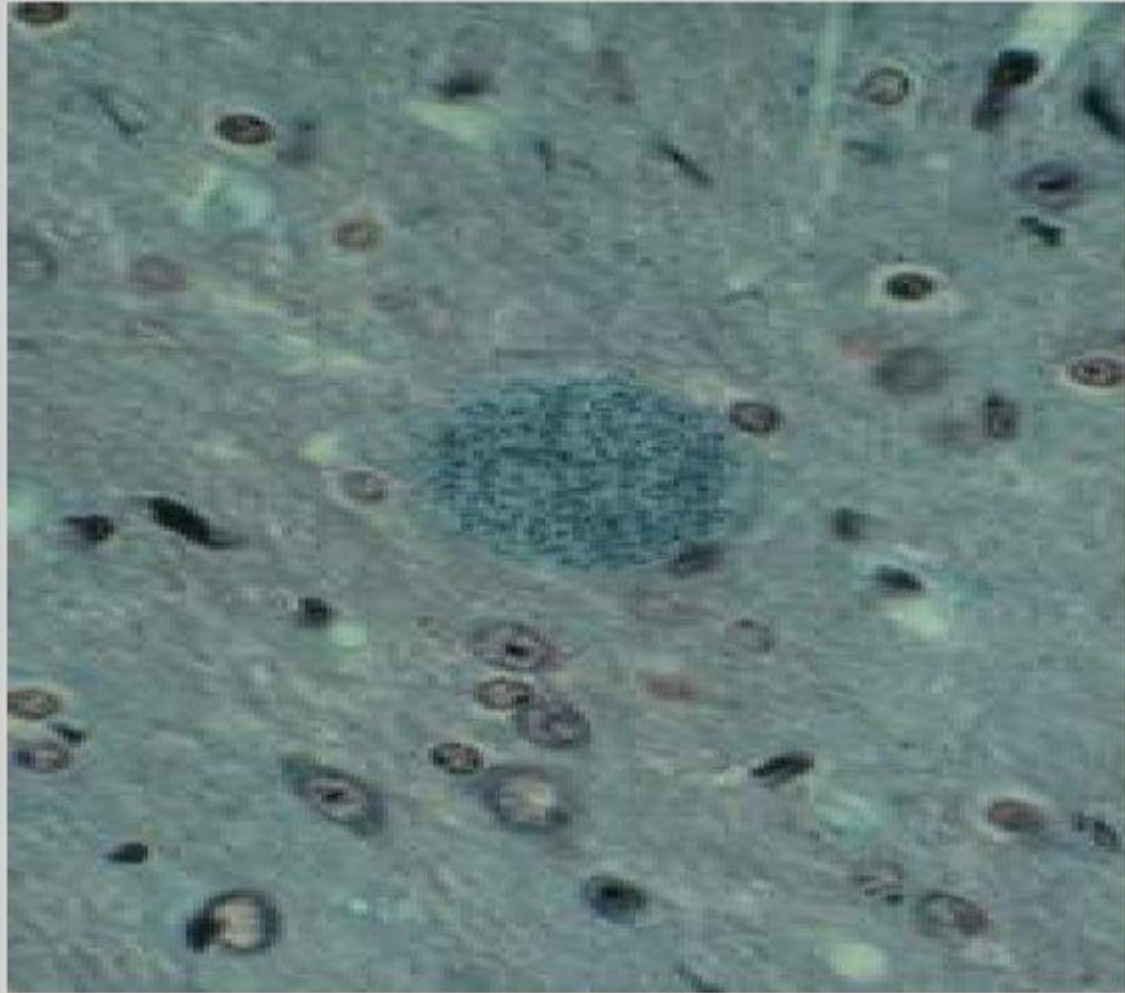
Подцарство: Protozoa

Типы:

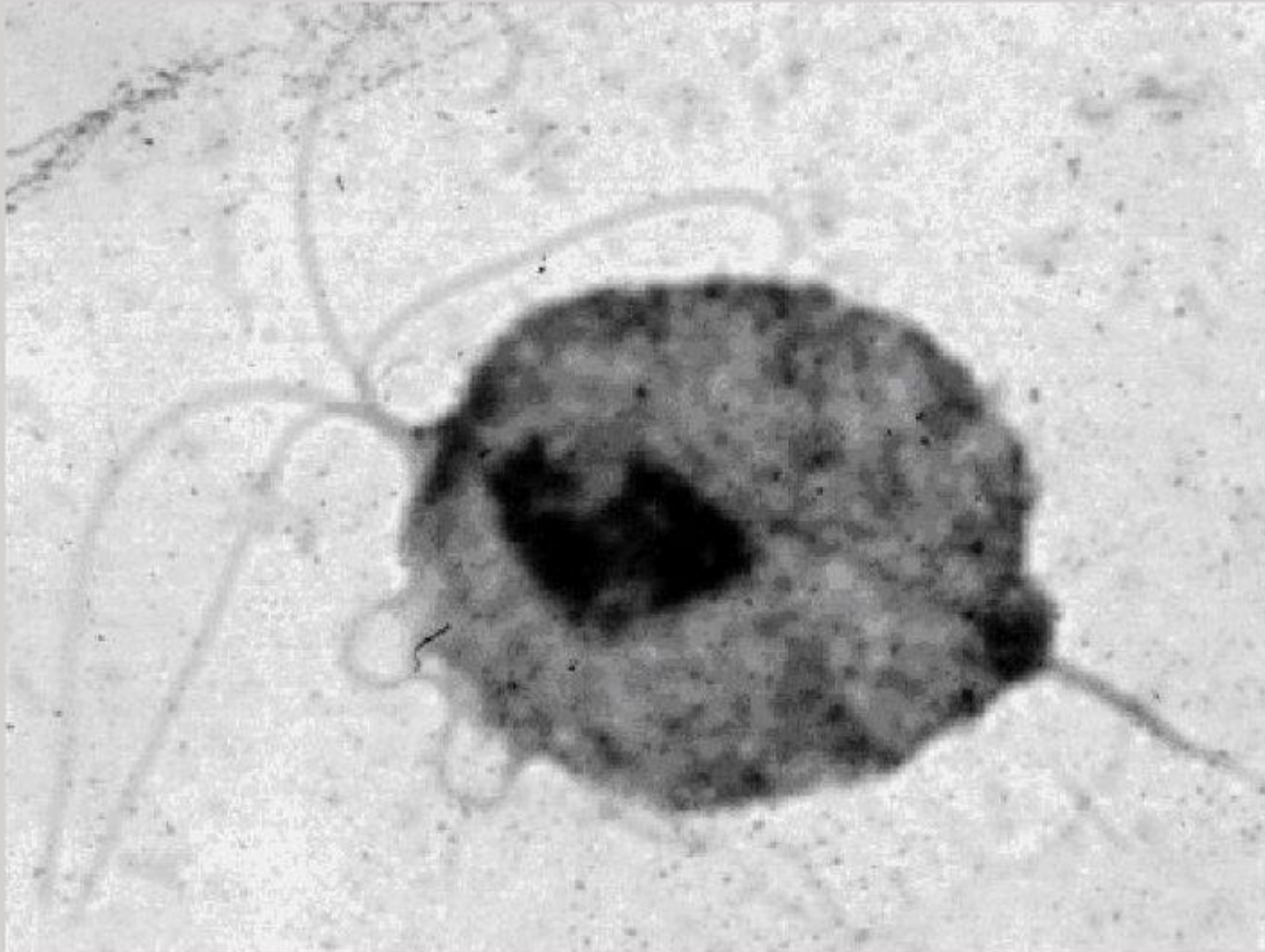
1. Sarcomastigophorae
2. Apicomplexa
3. Ciliophora
4. Microspora



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

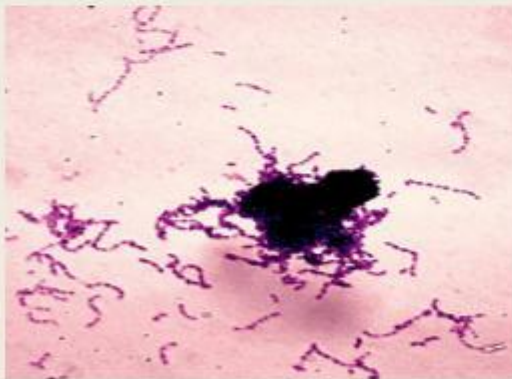
Основные виды красителей, которые применяются в микробиологической практике:

| 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

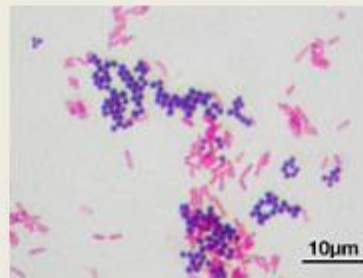
- ❑ 1 этап
- ❑ 1 краситель
- ❑ Можно оценить форму, размеры и взаимное расположение клеток



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

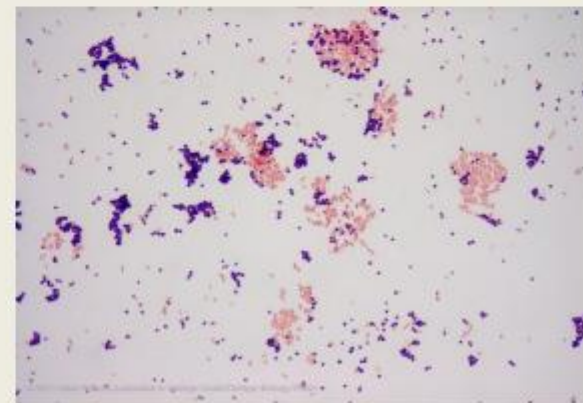
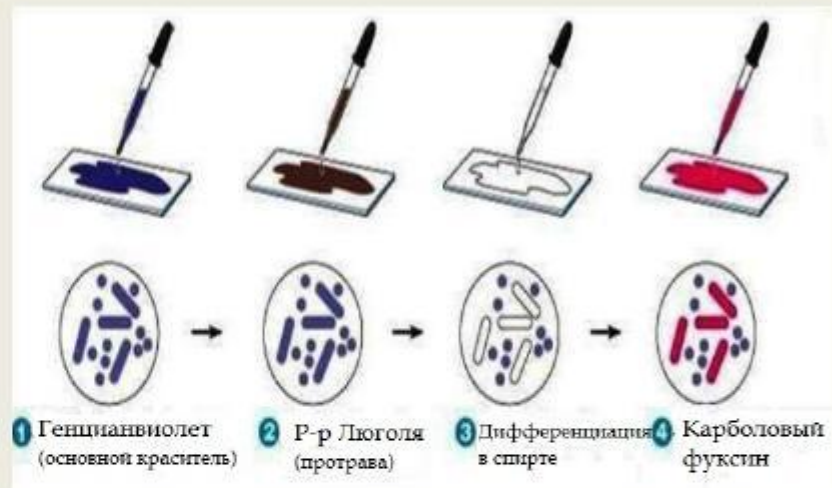
- ❑ Метод Грама – дифференцирует грамположительные и грамотрицательные бактерии – важный таксономический признак
- ❑ Метод Циля-Нильсена – дифференцирует кислотоустойчивые и некислотоустойчивые бактерии – принципиальное значение в диагностике туберкулеза

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

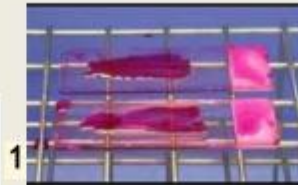
| | |
|---------------------------------|--|
| цель метода | Выявление грамположительных и грамотрицательных бактерий |
| основной краситель | карболовый раствор генцианвиолета |
| протрава | раствор Люголя (после окрашивания) |
| дифференцирующее вещество | этанол |
| дополнительный краситель | разбавленный 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 |



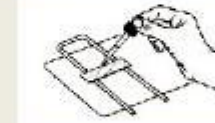
1



2 дифференциация в серной кислоте 20 сек.



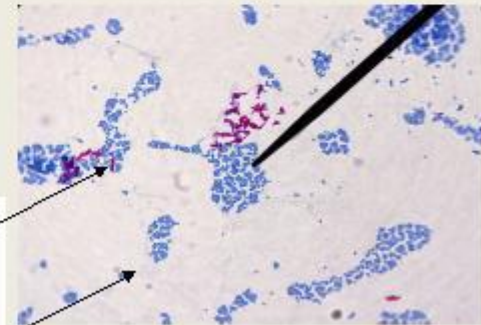
3 Промывка водой



4 окрашивание метиленовым синим

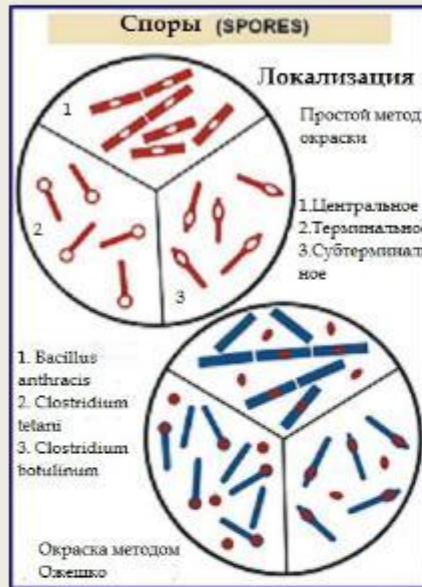


5 Промывка водой



Кислотоустойчивые –
Mycobacterium-
красные;
некислотоустойчивые –
Staphylococcus-синие

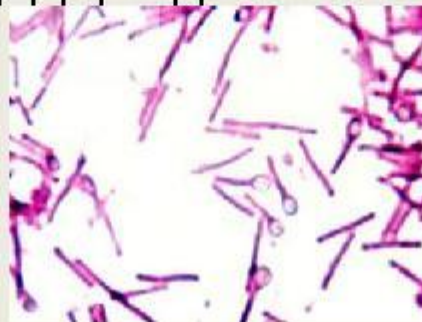
Методы выявления спор



- 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



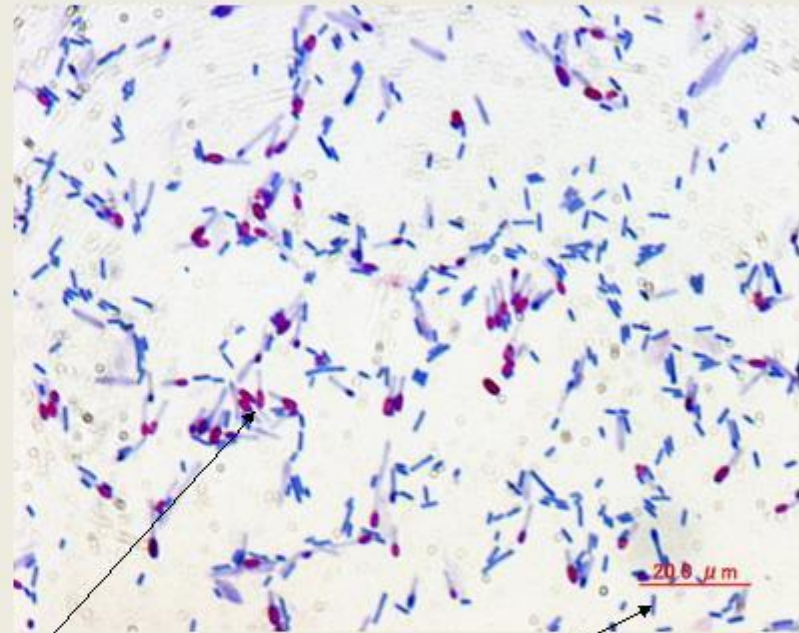
2. Clostridium Tetani



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 |

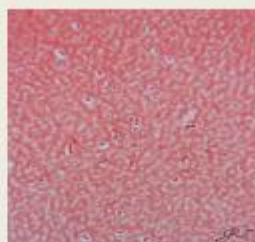


Споры малиновые, видны как эндоспоры внутри вегетативных клеток, так и отдельные споры

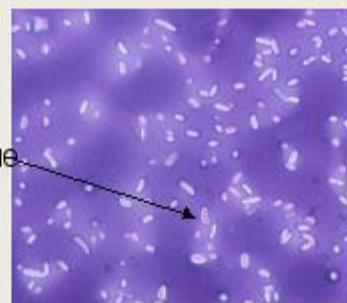
Вегетативные клетки синие

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

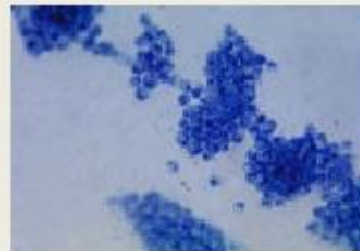
Метод Леффлера (простой метод)

□ 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.

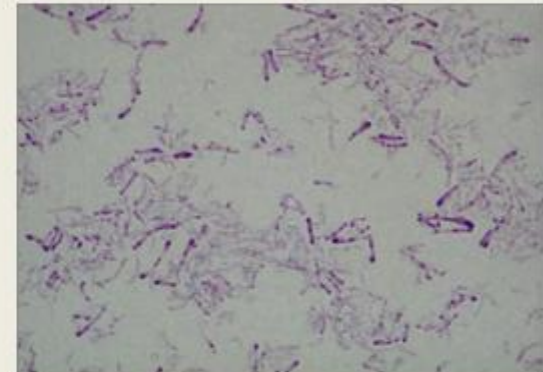


Corynebacterium diphtheriae окраска по Нейссеру



Candida albicans
окраска по

Леффлеру: в голубой



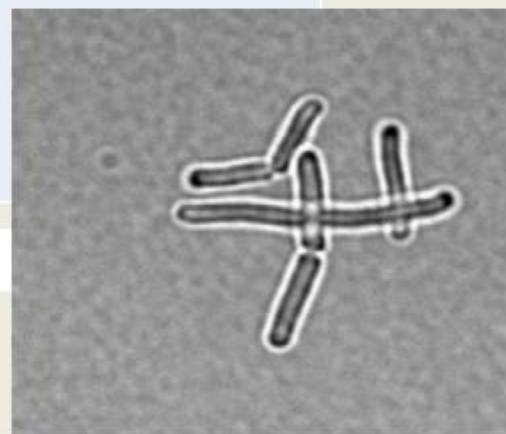
C. diphtheriae окраска по Леффлеру: на полюсах

палочек утолщения - зерна

Окраска клеточной стенки по Пешкову

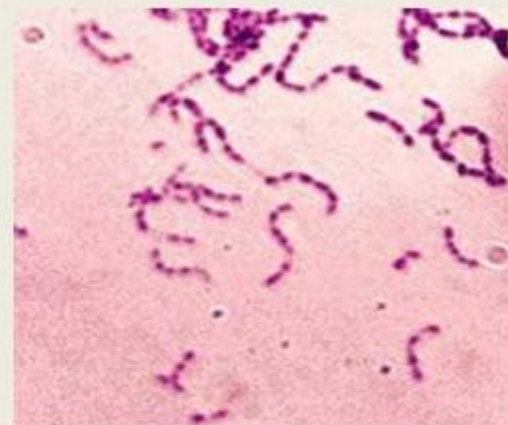
| | метод Пешкова (цитохимический) |
|---|---|
| цель метода | Выявление клеточной стенки бактерий |
| основной краситель | водный раствор фуксина |
| протрава | раствор танина |
| дифференцирующее вещество | - |
| дополнительный краситель | - |
| способ фиксации препарата-мазка | в жидкости Карнуа 15 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