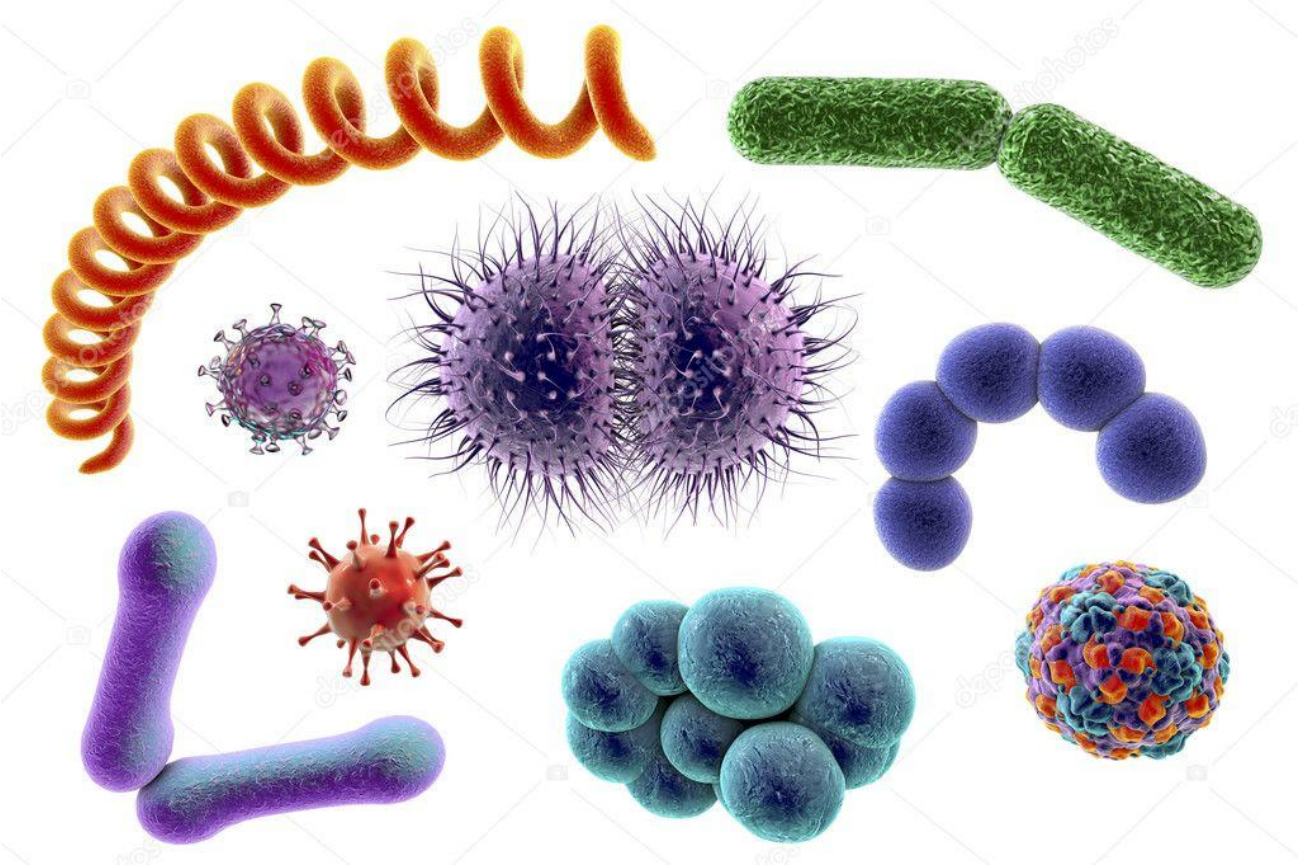
НОВЫЕ ЗНАНИЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ КОЛЛЕДЖ

Тема 1.2.1. Основы морфологии и методы изучения микроорганизмов.



План занятия

1.Понятие о микроорганизмах. Бактерии: виды, строение бактериальной клетки.

2.Микроскопические методы изучения морфологии бактерий: виды микроскопов, методы окраски. Дифференциация бактерий по морфологическим и тинкториальным (окрашивания) свойствам.

3. Приготовление препаратов из разного нативного материала и культуры микроорганизмов, окраска простым и сложными методами, микроскопия в иммерсии, описание препарата. **Правила техники безопасности при проведении микроскопических исследований.**

Морфология бактерий

Подавляющее большинство бактерий (за исключением актиномицетов и нитчатых цианобактерий) **одноклеточны** и размножаются **поперечным делением.**

Бактерии имеют разнообразную форму и размеры. В природе наиболее широко распространены тонкостенные грамотрицательные и толстостенные грамположительные бактерии.

Размеры бактерий варьируют в широких пределах.

1. Очень мелкие - до 0,1 мкм (микоплазмы, хламидии).
2. Мелкие - до 1,5 мкм (бруцеллы, стрептококки).
3. Средние - до 3,0 мкм (пастереллы, сальмонеллы).
4. Крупные - до 10,0 мкм (бациллы, клостридии).

Домен *Bacteria*

Тонкостенные бактерии (грамотрицательные)

Бактерии без клеточной стенки (микоплазмы, уреаплазмы)

Толстостенные бактерии (грамположительные)

Строение бактериальной клетки

Структурные компоненты бактериальной клетки делятся на **обязательные** (жизненно необходимые) и **необязательные**.

Строение бактериальной клетки

Обязательные структурные компоненты:

- (клеточная стенка);
- цитоплазматическая мембрана;
- цитоплазма;
- рибосомы;
- нуклеоид (ДНК).

Необязательные структурные компоненты:

- капсула;
- включения;
- жгутики;
- пили;
- плазмиды;
- споры.

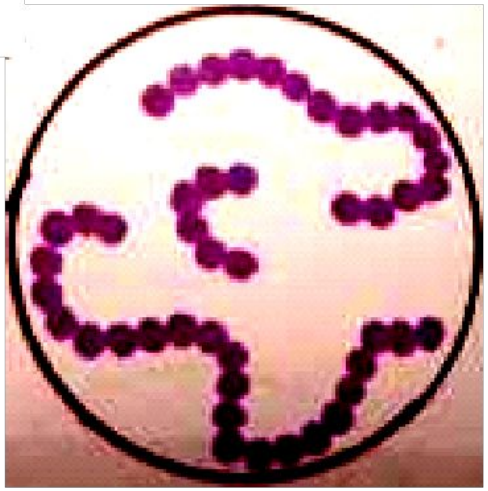
Морфология бактерий, имеющих клеточную стенку

НОВЫЕ ЗНАНИЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ КОЛЛЕДЖ

ТОНКОСТЕННЫЕ, ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ		ТОЛСТОСТЕННЫЕ, ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ	
Менингококки		Пневмококки	
Гонококки		Стрептококки	
Вейлонеллы		Стафилококки	
Палочки		Палочки	
Вибрионы		Бациллы*	1 2 3
Кампилобактерии, Хеликобактерии		Клостридии*	1 2 3
Спириллы		Коринебактерии	
Спирохеты		Микобактерии	
Риккетсии		Бифидобактерии	
Хламидии		Актиномицеты	

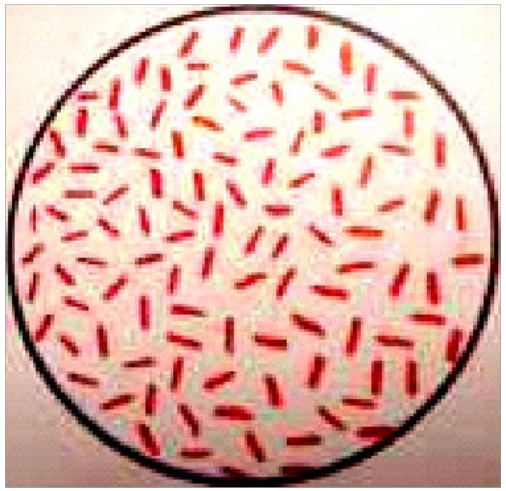
*Расположение спор: 1 – центральное, 2 – субтерминальное, 3 – терминальное.

По внешнему виду среди бактерий различают **шарообразные формы (кокки)**, **извитые формы** и **палочки**.



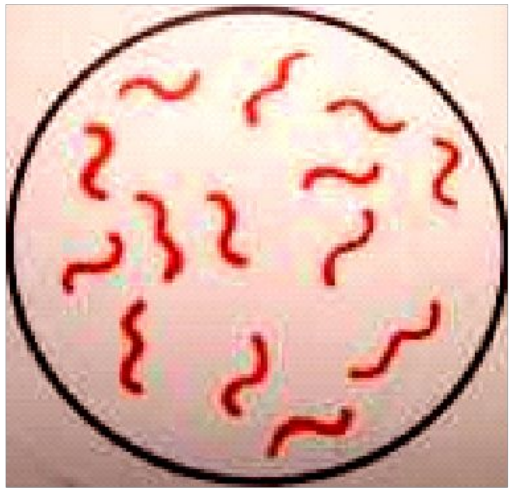
КОККИ

Монококки
Диплококки
Стрептококки
Тетракокки
Стафилококки
Сарцины



ПАЛОЧКИ

Бактерии
Бациллы
Клостридии



ИЗВИТЫЕ

Вибрионы
Спириллы
Спирохеты

НОВЫЕ ЗНАНИЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ КОЛЛЕДЖ

Кокки

-**Монококки** представляют собой одиночно расположенные шаровидные (кокковидные) бактерии,

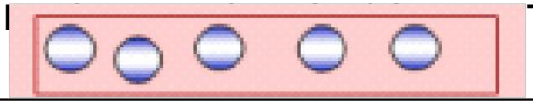
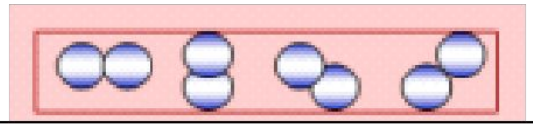
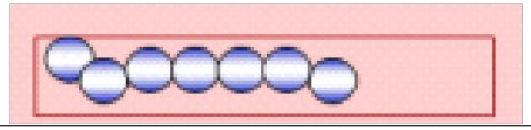
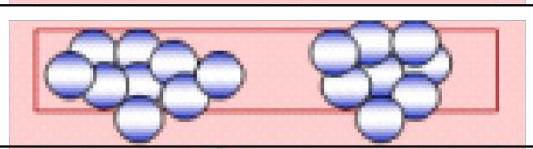
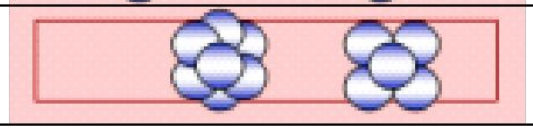
-**диплококки** – соединенные вместе 2 бактерии, --

-**стрептококки** – цепочка шаровидных бактерий,

-**тетракокки** – 4 соединенные вместе шаровидные бактерии,

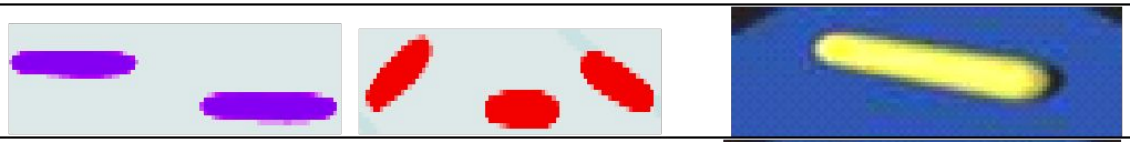
-**стафилококки** – шаровидные бактерии, соединенные в виде грозди винограда,

-**сарцины** – кокки уложен тюко

1. Монококки		
2. Диплококки		
3. Стрептококки		
4. Тетракокки		
5. Стафилококки		
6. Сарцины		

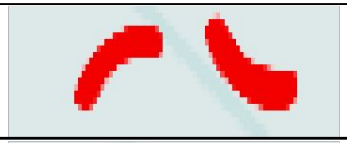
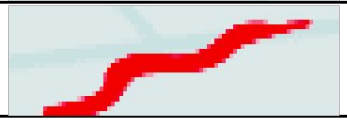
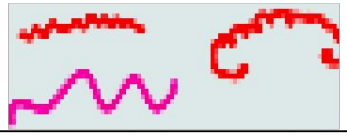
Палочки

Палочковидные формы представлены бактериями, не образующими спор; а также спорообразующими **бациллами** – аэробными бактериями, образующими споры, диаметр которых равен толщине бактерии; и **клостридиями** – анаэробными бактериями, образующими споры, диаметр которых больше толщины бактерий.

1. Бактерии	
2. Бациллы	
3. Клостридии	

Извитые формы

Извитые формы представлены **вибрионами** – изогнутыми бактериями; **спириллами** – спиралевидными бактериями; **спирохетами** – бактериями, изогнутыми и закрученными в виде локона.

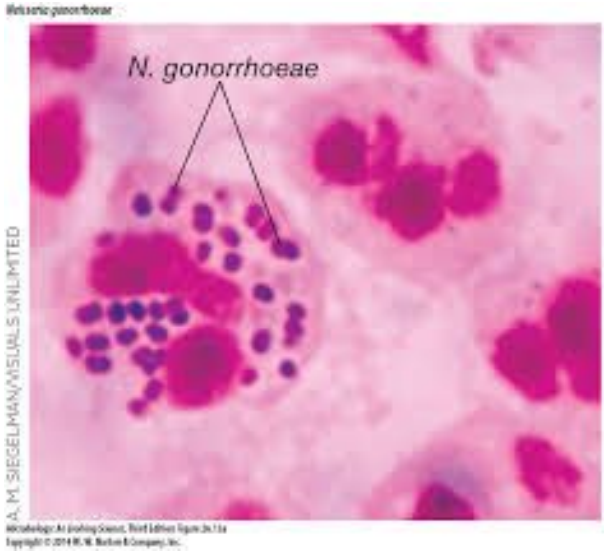
1. Вибрионы		
2. Спириллы		
3. Спирохеты		

Патогенные для человека **спирохеты** представлены 3 родами: *Treponema, Borrelia, Leptospira*. Трепонемы имеют вид тонких нитей, штопорообразно закрученных, количество завитков 8-12 (например, *Treponema pallidum* – возбудитель сифилиса). Боррелии имеют по 3-8 крупных завитков (например, возбудители болезни Лайма – *Borrelia burgdorferi* и возвратного тифа – *B.recurrentis*). Лептоспиры образуют 15-30 мелких завитков, завитки неглубокие и частые, концы лептоспир изогнуты наподобие крючков с утолщениями на концах в виде букв S или C (*Leptospira interrogans* - возбудитель лептоспироза).

Форма микроорганизмов **не является** основным признаком, т.к. среди бактерий, имеющих одни и те же морфологические свойства, встречаются различные патогенные и сапрофитные виды, относящиеся к разным семействам и родам.

Однако у некоторых бактерий имеются морфологические особенности, позволяющие провести идентификацию.

Bacillus anthracis (бацилла сибирской язвы) –клетки с прямыми



Neisseria gonorrhoeae (гонококк) – незавершённый фагоцитоз, диплококки

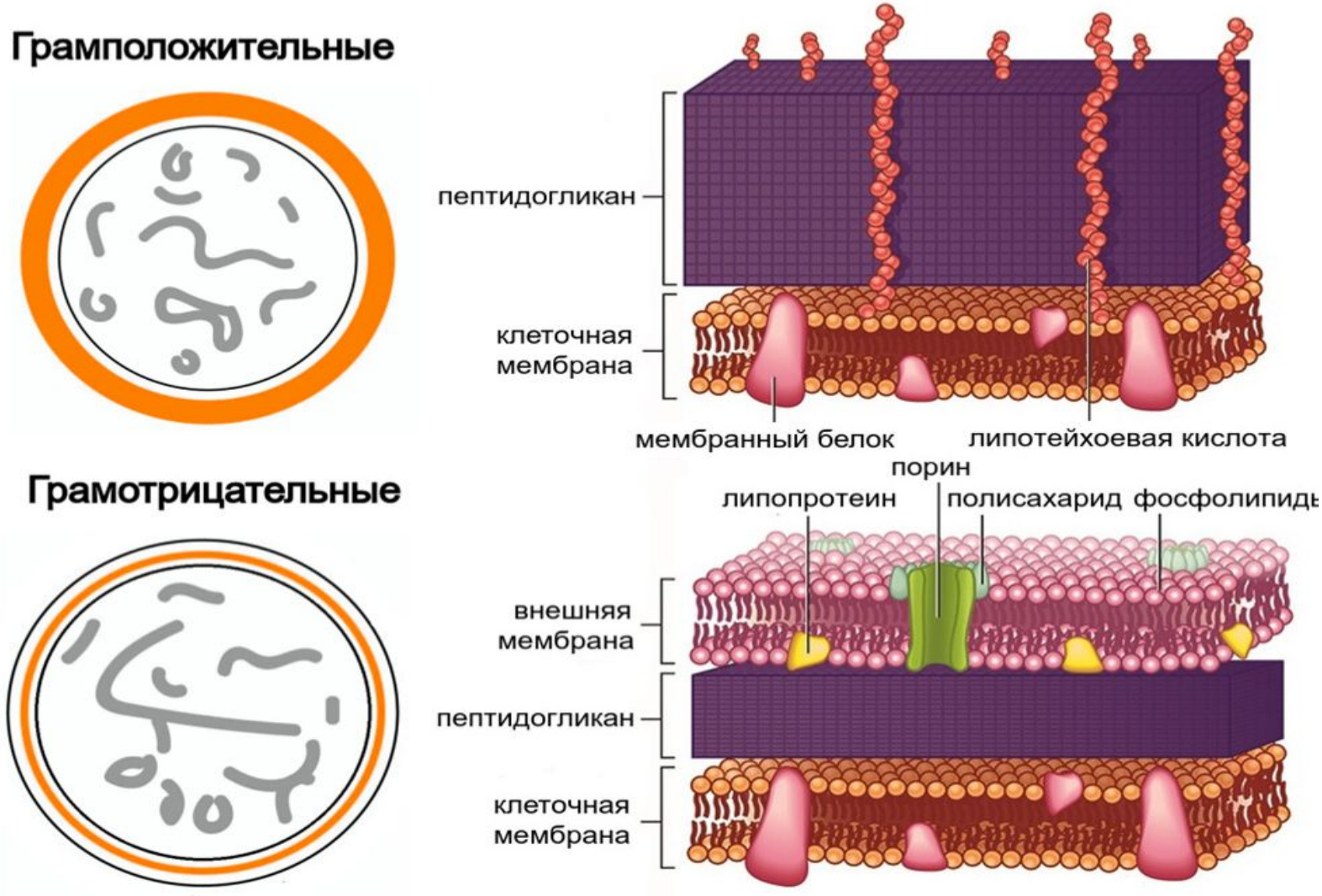
Строение бактериальной клетки. КС

Функции клеточной стенки :

1. Является осмотическим барьером;
2. Определяет форму бактериальной клетки;
3. Защищает клетку от воздействий окружающей среды;
4. Несет разнообразные рецепторы, способствующие прикреплению бактериофагов, антител, а также различных химических соединений;
5. Через клеточную стенку в клетку поступают питательные вещества и выделяются продукты обмена;

Строение клеточной стенки бактерий.

У бактерий имеется 2 типа строения клеточной стенки. В обоих случаях ее основу составляет **пептидогликан** (**м**



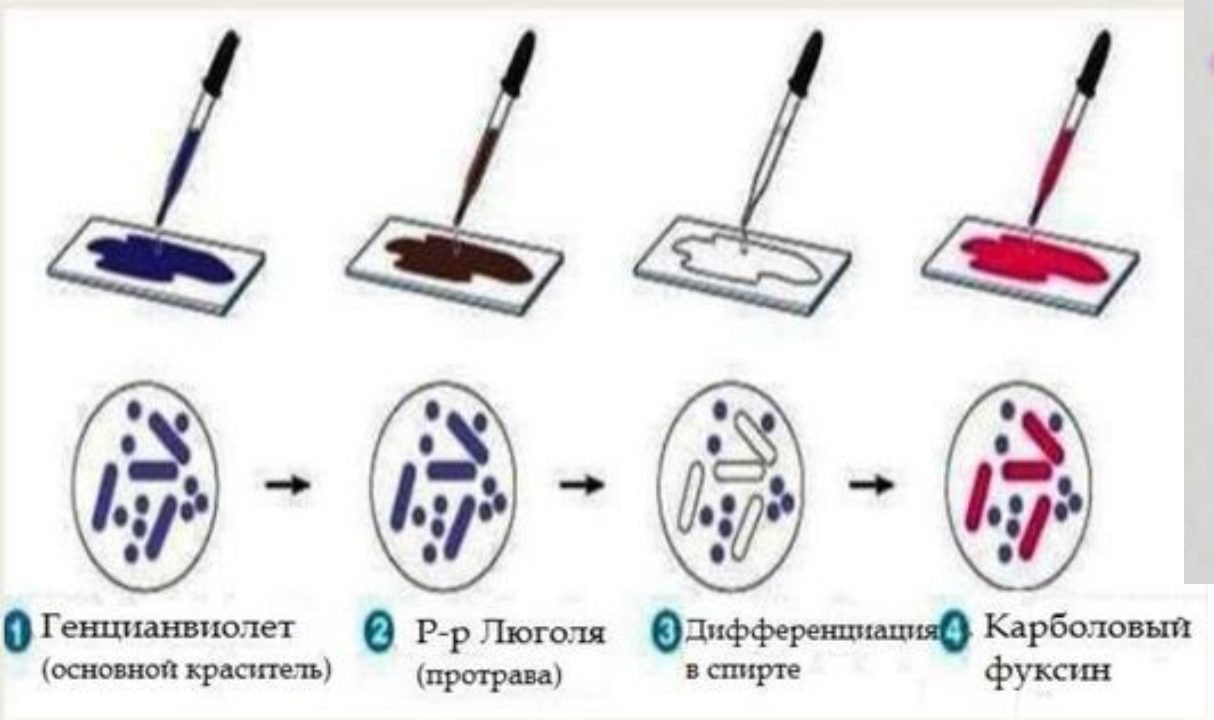
Строение клеточной стенки бакте

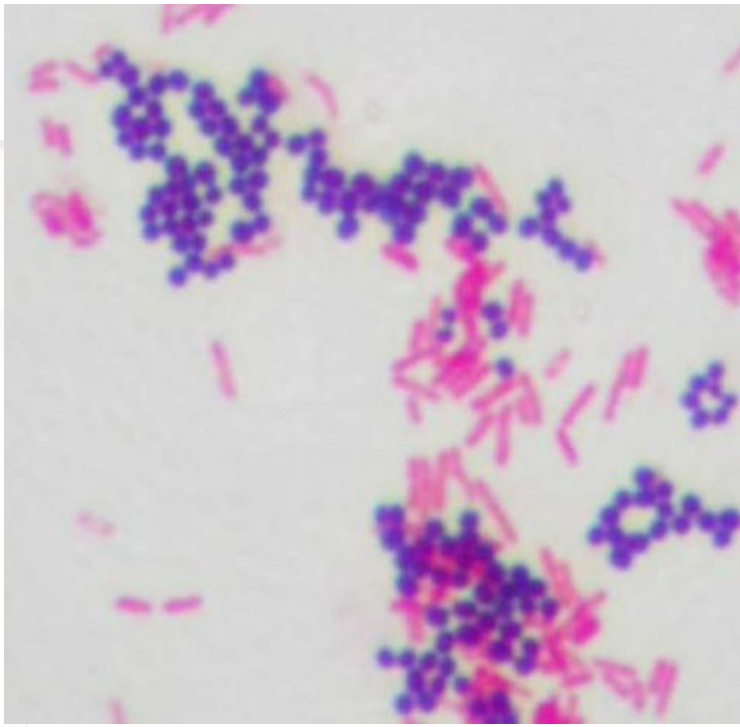
У **Гр+** бактерий **муреин** составляет до 90 % массы клеточной стенки и образует многослойный (до 20-30 слоев) каркас. Такие бактерии при **окраске по методу Грама** прочно удерживают комплекс генцианвиолет в комплексе с йодом, (**сине-фиолетовый** цвет) и называются **грамполо-жительными Гр+.**

У **Гр-** бактерий поверх слоев **муреина** располагается слой липополисахаридов. Эти бактерии при окраске по методу Грама не способны прочно удерживать комплекс генцианового фиолетового и йода и, соответственно, обесцвечиваются спиртом, прокрашиваясь дополнительным красителем - фуксином в **розово-красный цвет.** Они называются **грамотрицательными Гр-**

Схема окрашивания по Граму

1. **Кристалвиолет (генцианвиолет)** 2-3 мин.
2. **Раствор Люголя** (раствор I_2 в KI) на 1 мин.
3. 95% этиловый спирт - несколько раз до тех пор, пока не перестанут отходить фиолетовые струйки красителя.
4. Вода
5. **Фуксина Циля** 1-2 мин





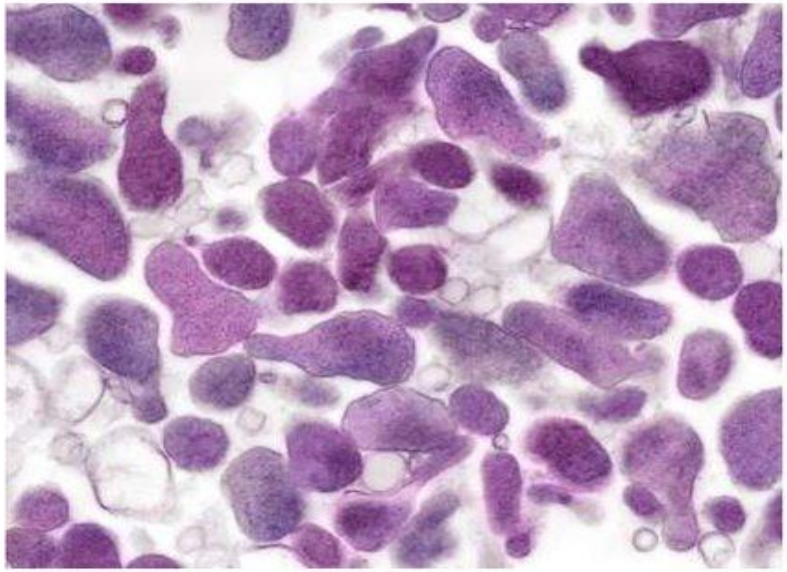
Бактерии без клеточной стенки

Микоплазмы

- Мелкие неподвижные гр- бактерии
- Полиморфные, чаще сферические, иногда нитевидные
- Могут проходить через бактериальные фильтры
- Не имеют КС
- Инфицируют

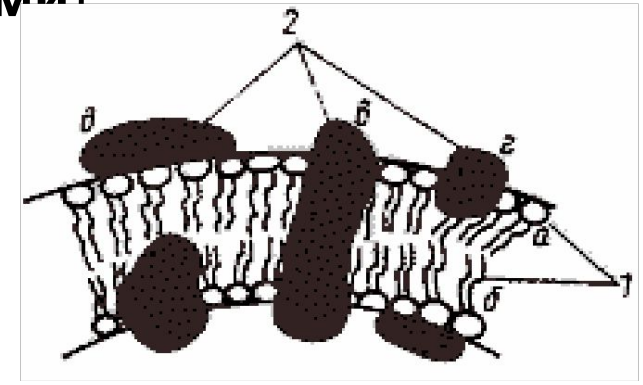
дыхательные пути и

мочеполовую систему

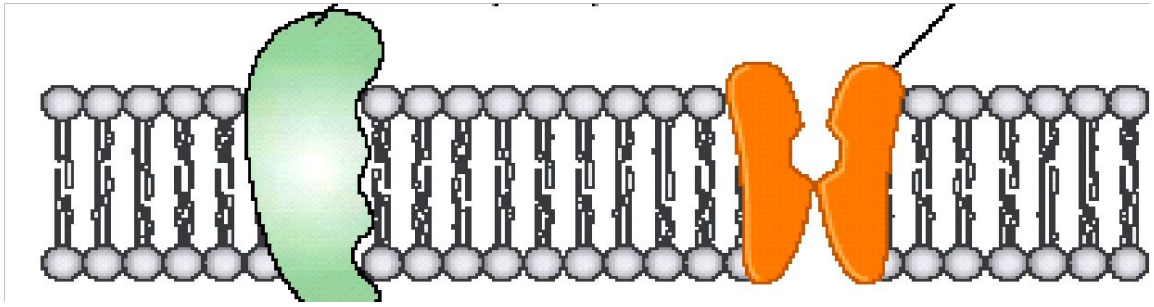


Строение цитоплазматической мембраны

К клеточной стенке бактерий примыкает **цитоплазматическая мембрана,** строение которой аналогично мембранам эукариотов (состоит из **двойного слоя липидов, главным образом фосфолипидов, со встроенными поверхностными и интегральными белками)**



1 - молекулы липидов:
а – гидрофильная "голова";
б - гидрофобный "хвост";
2 - молекулы белков:
в – интегральная
г – периферическая
д - поверхностная



Строение цитоплазматической мембраны

Функции ЦПМ

Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ) обеспечивает:

1. Избирательную проницаемость и транспорт веществ в клетку;
2. Транспорт электронов и (синтез АТФ);
3. Выделение гидролитических экзоферментов;
4. Биосинтез различных полимеров.

ЦПМ отделяет цитоплазму от клеточной стенки, служит осмотическим барьером клетки, регулирует транспорт веществ. Нередко она образует впячивания - **мезосомы**.

С ЦПМ и её производными связан также биосинтез клеточной стенки и спорообразование. К ней прикреплены жгутики, геномная (хромосомная) ДНК.

В цитоплазме локализованы рибосомы и бактериальный нуклеоид, в ней также могут находиться включения и плазмиды (внехромосомная ДНК).

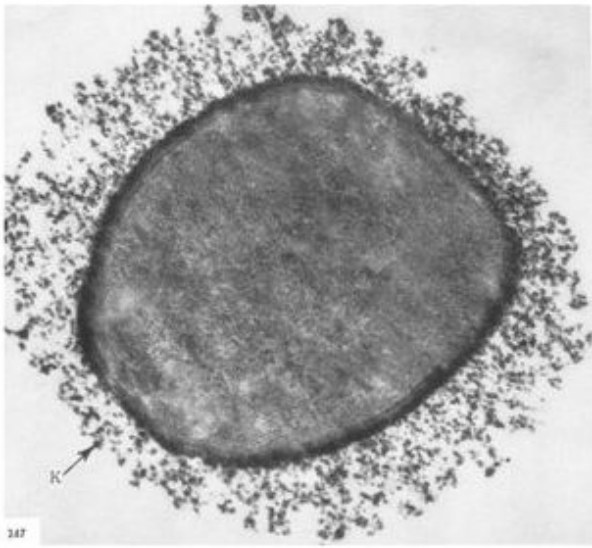
НОВЫЕ ЗНАНИЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ КОЛЛЕДЖ

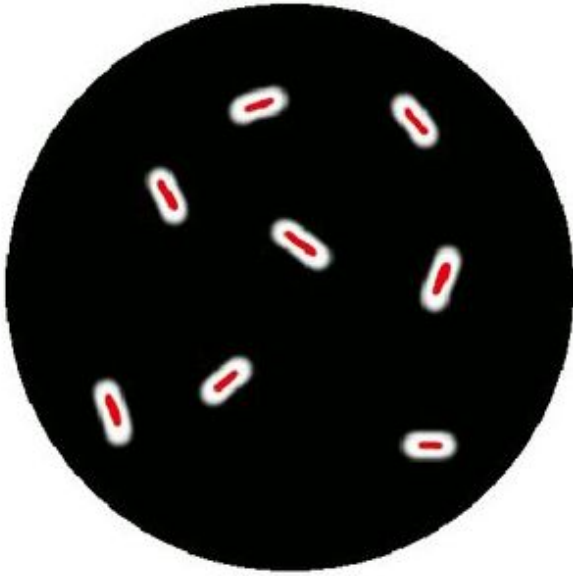
НОВЫЕ ЗНАНИЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ КОЛЛЕДЖ

Строение бактериальной клетки.

Капсула

- **Капсула** – слизистая структура толщиной более 0,2 мкм;
- **Состав**: полисахариды и полипептиды (мономеры D-глутаминовой кислоты).
- Капсула гидрофильна, препятствует фагоцитозу бактерий.
- **Функции** капсулы: защитные, адгезивные, патогенные и антигенные.
- **Выявление**: негативное контрастирование по **Бурри-Гинсу**;

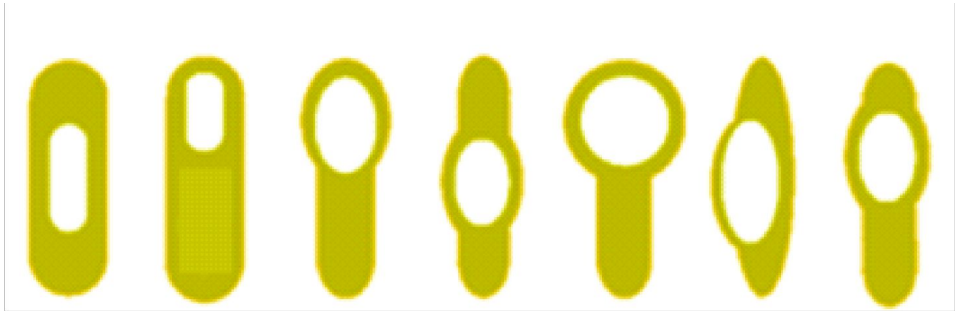




Строение бактериальной клетки.
Спора

Споры бактерий представляют собой форму существования бактериальных клеток в состоянии анабиоза и образуются при ***неблагоприятных условиях внешней среды.***

Споры располагаются внутри бактериальной клетки терминально, ногда латерально.



Расположение спор:

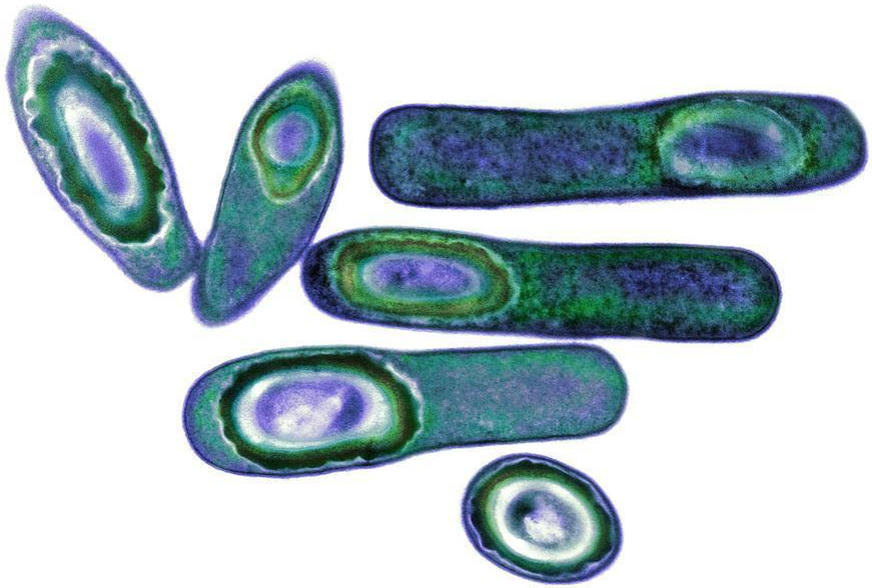
1, 4 – центральное; 2, 3, 5 – терминальное; 6 – латеральное;

7 – субтерминальное

НОВЫЕ ЗНАНИЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ КОЛЛЕДЖ

Строение бактериальной клетки. Спора

В процессе спорообразования бактериальная клетка почти полностью теряет воду, сморщивается, клеточная стенка уплотняется. Появляется новое вещество - **дипиколинат кальция**, которое образует комплексы с биополимерами клетки, устойчивые к действию температуры и ультрафиолетовых лучей. Бактерии в **споровой форме не размножаются**. Споры образуют **только Гр+ (**



НОВЫЕ ЗНАНИЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ КОЛЛЕДЖ

НОВЫЕ ЗНАНИЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ КОЛЛЕДЖ

Спорообразование у бактерий

- Споры бактерий переносят нагревание до +140С и охлаждение до -273С. Они выдерживают высушивание, не погибают при кипячении, замораживании. Споры легко разносятся ветром и т.д. Их много в воздухе и почве.
- В почве споры растений могут сохранятся 20-30 и более лет. При наступлении благоприятных условий спора прорастает и становится жизнедеятельной бактерией.

Строение бактериальной клетки. Жгутики

Основная функция жгутиков - движение.

Характеристика жгутиков:

- органоиды движения (скользящее, плавающее) бактерий;
- белковая природа (сократительный белок **флагеллин** – похож на миозин);
- тонкие, длинные;
- состоят из спирально закрученной нити, крюка и базального тельца (базальной структуры).

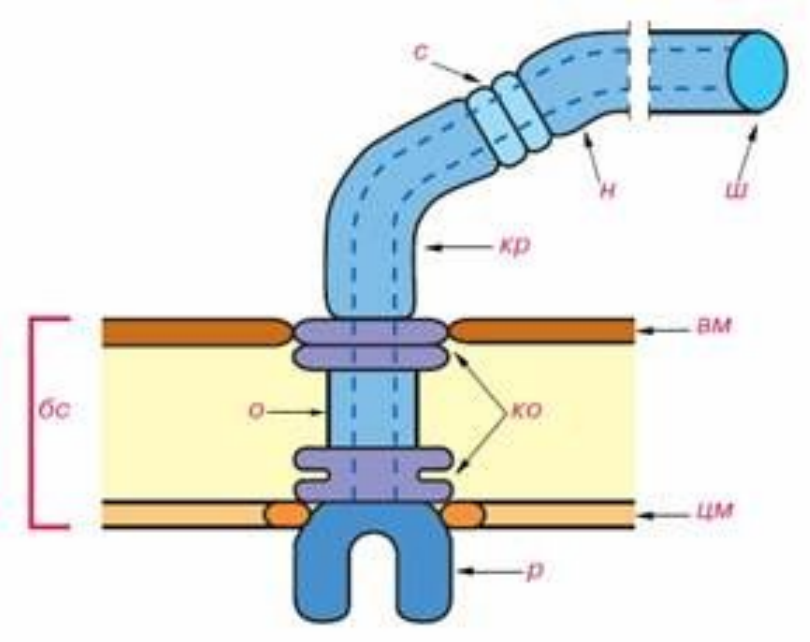


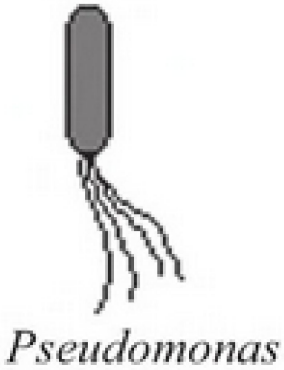
Рис. 1. Схема строения бактериального жгутика: *бс* – базальная структура, *вм* – внешняя мембрана, *цм* – цитоплазматическая мембрана, *р* – ротор, *о* – ось, *ко* – кольца жгутикового мотора, *кр* – крюк, *с* – цилиндрики-соединители, *н* – нить жгутика, *ш* – шапочка

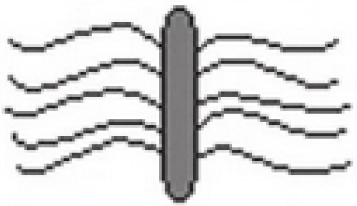
НОВЫЕ ЗНАНИЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ КОЛЛЕДЖ

Строение бактериальной клетки. Жгутики

В зависимости от количества и расположения жгутиков бактерии подразделяются на **4 группы**:

1. Монотрихи - имеют только один жгутик (род *Vibrio*),
2. Лофотрихи - пучок жгутиков на одном полюсе клетки (род *Pseudomonas*)
3. Амфитрихи - жгутики (один или пучок) расположены на обоих полюсах клетки (род *Spirillum*),
4. Перитрихи - жгутики расположены по всей поверхности клетки (род *Escherichia, Salmonella*).





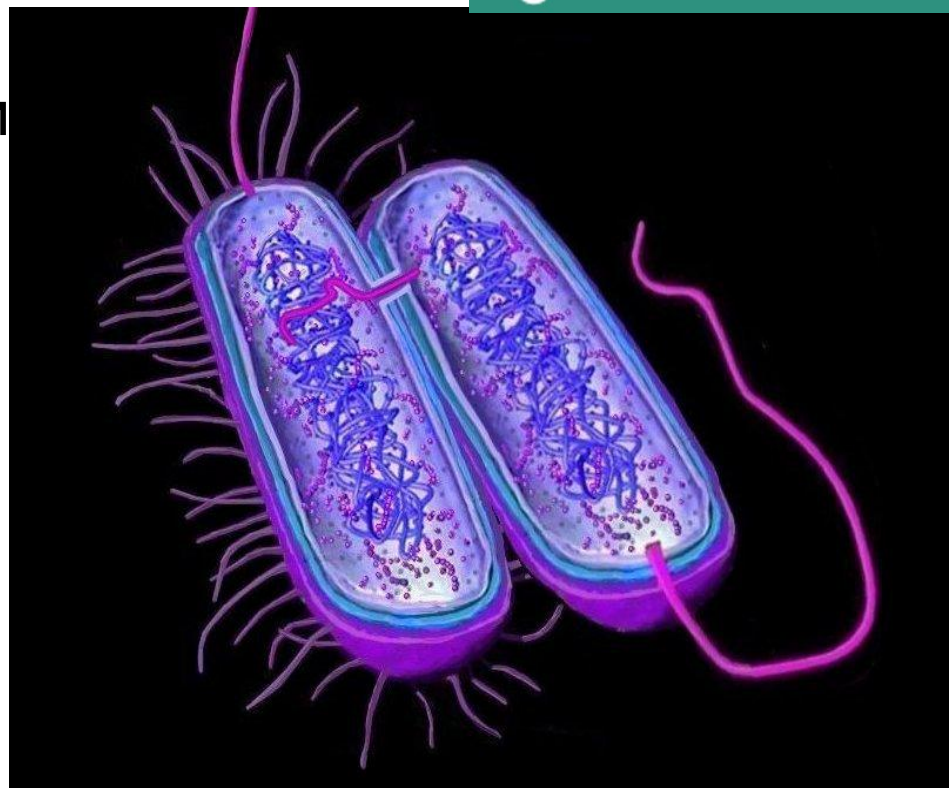
монотрих лофотрих амфитрих перитрих

Строение бактериальной клетки. Пили

На поверхности ряда бактерий существуют белковые образования – **пили (**ворсинки ,фимбрии, микроворсинки).

Функции пилей:

- слипание бактерий между собой;
- прикрепление бактерий к поверхностям;
- адгезия (прилипание к эукариотам);
- транспорт метаболитов;
- половые пили для конъюгаци



Строение бактериальной клетки. Генетический материал.

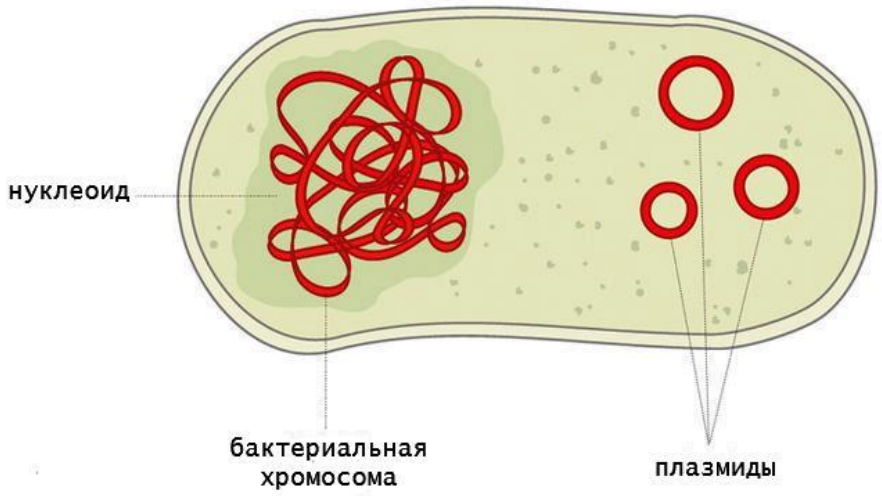
– **НУКЛЕОИД - одна замкнутая кольцевидная хромосома, содержащая до 4000 отдельных генов, необходимых для поддержания жизнедеятельности и размножения бактерий, бактериальная клетка гаплоидна.**

НОВЫЕ ЗНАНИЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ КОЛЛЕДЖ

Строение бактериальной клетки. Генетический материал.

Плазмиды образованы молекулами ДНК.

- **Регуляторные плазмиды** участвуют в компенсировании тех или иных дефектов метаболизма бактериальной клетки.
- **Кодирующие плазмиды** привносят в бактериальную клетку новую генетическую информацию, кодирующую новые, необычные свойства (например, устойчивость к антибиотикам)



НОВЫЕ ЗНАНИЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ КОЛЛЕДЖ

Строение бактериальной клетки. Генетический материал.

Плазмиды

- ***F-плазмиды*** **контролируют *синтез F-пилей*, способствующих передаче генетического материала от бактерий-доноров (F+) к бактериям-реципиентам (F–) в процессе конъюгации**
- ***R-плазмиды*** **(от англ. *resistance*, устойчивость) кодируют устойчивость к лекарственным препаратам.**
- ***Плазмиды патогенности*** **контролируют вирулентные свойства бактерий и токсинообразование (плазмиды включают tox+-гены).**
- ***Плазмиды бактериоциногении*** **кодируют синтез бактериоцинов - белковых продуктов, вызывающих гибель бактерий того же или близких видов. Плазмиды могут кодировать устойчивость к антибиотикам.**

изучения морфологии бактерий.

Микроскопия:

- *световая (просвечивающая, фазово-контрастная, темно-польная)*
- *электронная*
- *люминесцентная*

Микроскопические методы изучения морфологии бактерий.

Микроскопический метод исследования

- это изучение под микроскопом окрашенных препаратов из исследуемого материала:

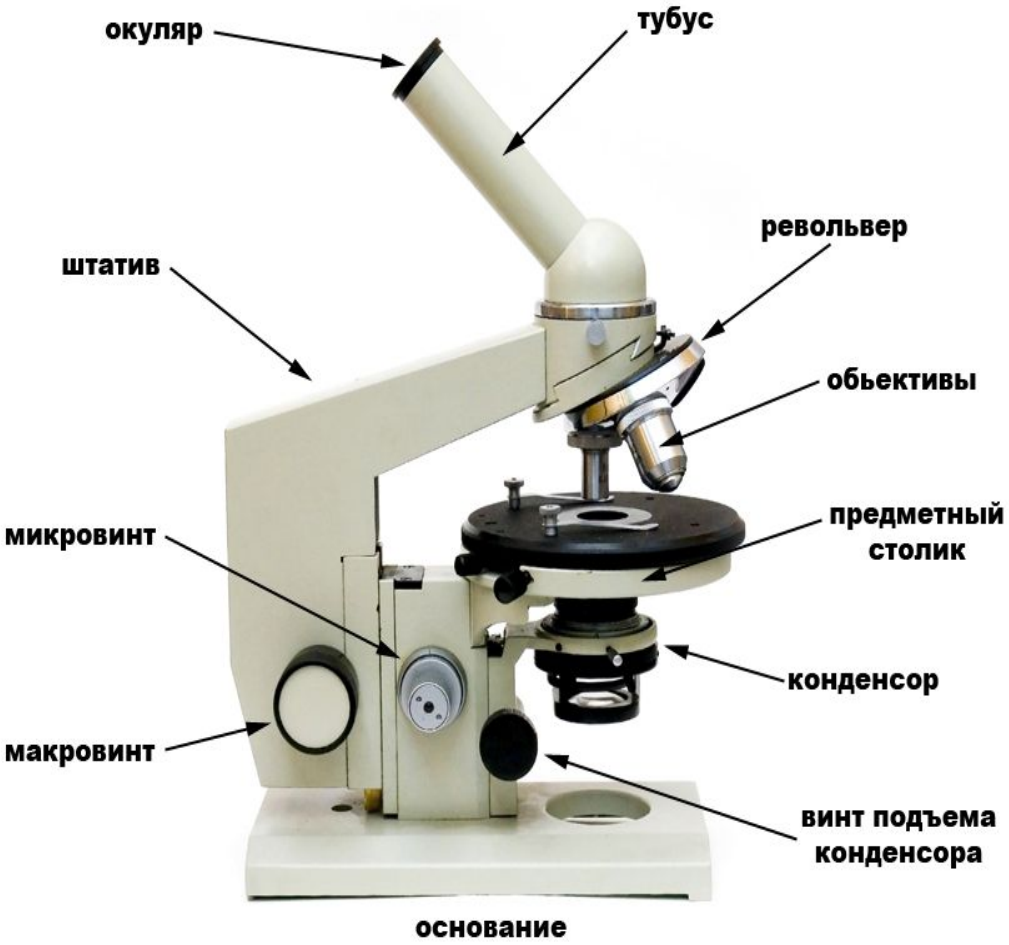
Достоинства:

-быстрый;

-ранний.

Недостатки:

-неточный (ориентировочный)



Микроскопические методы изучения морфологии бактерий.

С ветовой микроскоп состоит из частей:

механической
предназначена для устойчивости прибора, удобства пользования:
- подставка (ножка)
- тубусодержатель
- тубус
- револьвер
- предметный столик
- макровинт
- микровинт

оптической
предназначена для освещения и увеличения объектов:
Осветительный аппарат
находится под предметным столиком
- зеркало плосковогнутое (при искусственном освещении используется вогнутая сторона зеркала)
- диафрагма (регулирует объем светового пучка)
- конденсор (в фокусе конденсора собираются параллельные лучи света)

Для увеличения:
- объективы:
малый х8
большой х40
иммерсионный х90
- окуляры:
х7, х10, х15 раз

НОВЫЕ ЗНАНИЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ КОЛЛЕДЖ

Микроскопические методы изучения морфологии бактерий.

Общее увеличение микроскопа равно произведению увеличения объектива на увеличение окуляра (например, 10х40=400).

Разрешающая способность микроскопа – это размер наименьшего объекта, который можно увидеть в данный микроскоп.

Для **световых микроскопов** разрешающая способность – 0,2 мкм, для электронного - в 100-1000 раз выше.

Микроскопические методы изучения морфологии бактерий иммерсионная

Системы микроскопии

сухая

-между объектом и объективом находится воздух;

- используется для изучения крупных биологических объектов (ботанических, гистологических);

- максимальное увеличение объектива ×40

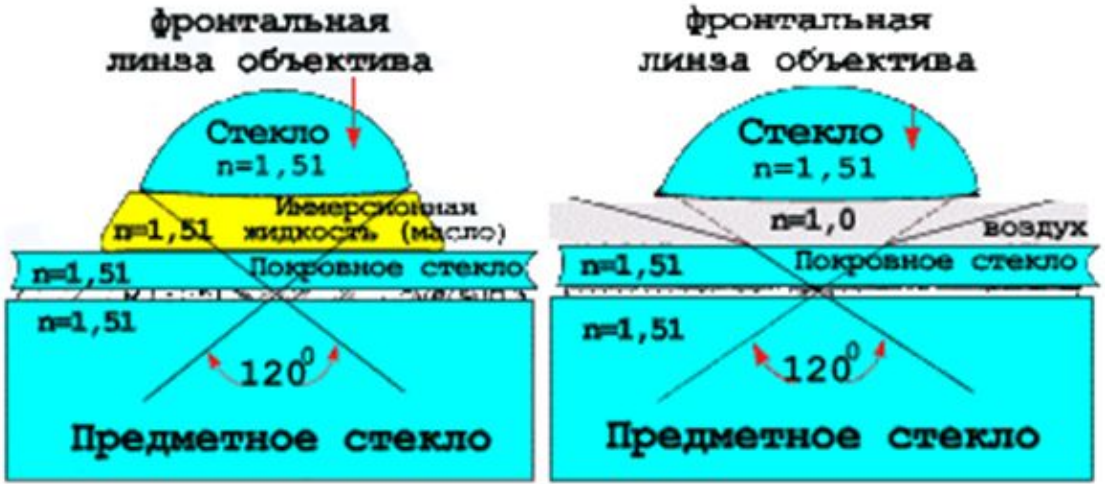
иммерсионная

- между объектом и объективом - жидкость (масло, вода);

- используется для изучения микроорганизмов;

- увеличение объектива ×90

Иммер-



Сухая

НОВЫЕ ЗНАНИЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ КОЛЛЕДЖ

Микроскопические методы изучения морфологии бактерий

Преимущества иммерсионной системы

1. **Большее увеличение** (увеличивает в 90 раз вместо 40 в сухой системе микроскопии)

2. **Лучшая освещенность** за счет создания однородной среды для прохождения лучей света с помощью иммерсионного масла

Микроскопические методы изучения морфологии бактерий

Правила работы с микроскопом при использовании иммерсионной системы:

1. Настроить освещение микроскопа, используя вогнутое зеркало и объектив.
2. На приготовленный и окрашенный мазок на предметном стекле нанести каплю иммерсионного масла и поместить его на предметный столик, укрепив зажимами.
3. Повернуть револьвер до отметки иммерсионного объектива 90 х.
4. Осторожно погрузить объектив в каплю масла под углом бокового зрения.
5. Установить ориентировочный фокус при помощи макровинта.
6. Провести окончательную фокусировку препарата микровинтом, вращая его в пределах только одного оборота. Нельзя допускать соприкосновения объектива с препаратом, так как это может повлечь поломку покровного стекла или фронтальной линзы (свободное расстояние иммерсионного объектива 0,1-1мм).
7. По окончании работы микроскопа необходимо вытереть масло с иммерсионного объектива и перевести револьвер на малый объектив 8х.

Препараты для микроскопии

Препараты бывают двух типов:

1.**Нативные** (живые, препараты живых клеток).Долго не хранятся, основное назначение –определение подвижности клеток.

2.**Фиксированные окрашенные.** Хранятся долго, безопасны в использовании, на них видны морфологические особенности клеток.

Приготовление препаратов. Окрашенные препараты. Методы окраски.

Методы

простые (ориентировочные)	сложные (дифференцирующие)
1) окрашивают одним красителем анилинового ряда - основным или кислым: - кислый фуксин -эозин - метиленовый синий - генциановый фиолетовый	1) используют несколько красителей (основная и вспомогательные краски, обесцвечивающие жидкости (этанол) - метод Грама - окраска по Нейссеру - Гинса-Бурри (выявление капсул) - Циля-Нильсена (выявление спор)
2) используются для изучения морфологии микроорганизмов	2) используются для определения не только морфологии, но и химического состава и структуры микробных клеток

В микробиологии чаще всего используют основные красители (основной фуксин, метиленовая синь)

Техника приготовления фиксированных окрашенных препаратов

Техника приготовления фиксированных окрашенных препаратов

1. Приготовление мазка

1) с жидкой питательной среды культуру берут петлей и каплю наносят непосредственно на стекло (без воды)

2) с плотной питательной среды на предметное стекло наносят небольшую каплю воды, в которой эмульгируют исследуемый материал и распределяют по площади около 2 см^2.

№ препарата пишут на лицевой стороне, а с обратной стороны местонахождения мазка обводят восковым карандашом.

2. Высушивание

на воздухе

высоко над пламенем спиртовки мазком вверх

3. Фиксация

Цель: - прикрепить микробов к стеклу
- обеззаразить патогенные микробы
- убитые микробы лучше окрашиваются

Методы фиксации

<u>физический</u>
- над пламенем спиртовки мазком вверх (3 раза круговыми движениями)

<u>химический</u>
- более щадящий по сравнению с физическим: мазок погружают в фиксатор (этанол, ацетон, формалин и др.) на определенное время

4. Окраска

Методы

<u>простые</u>

<u>сложные</u>

НОВЫЕ ЗНАНИЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ КОЛЛЕДЖ

Дифференциация бактерий по морфологическим и тинкториальным свойствам

Тинкториальные свойства- свойства микроорганизмов, характеризующие их **способность вступать в реакцию с красителями и окрашиваться определённым образом.** После изучения свойств бактерий сопоставляют полученные данные с признаками бактерий, имеющимися в классификационных схемах или определителях м/о (Берджи), и проводят их родовую/видовую идентификацию.