

ВВЕДЕНИЕ В МИКРОБИОЛОГИЮ
СИСТЕМАТИКА И НОМЕНКЛАТУРА
МИКРООРГАНИЗМОВ
СТРОЕНИЕ ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ
И ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ

The fantastic world of Microbiology



ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ МИКРОБИОЛОГИИ

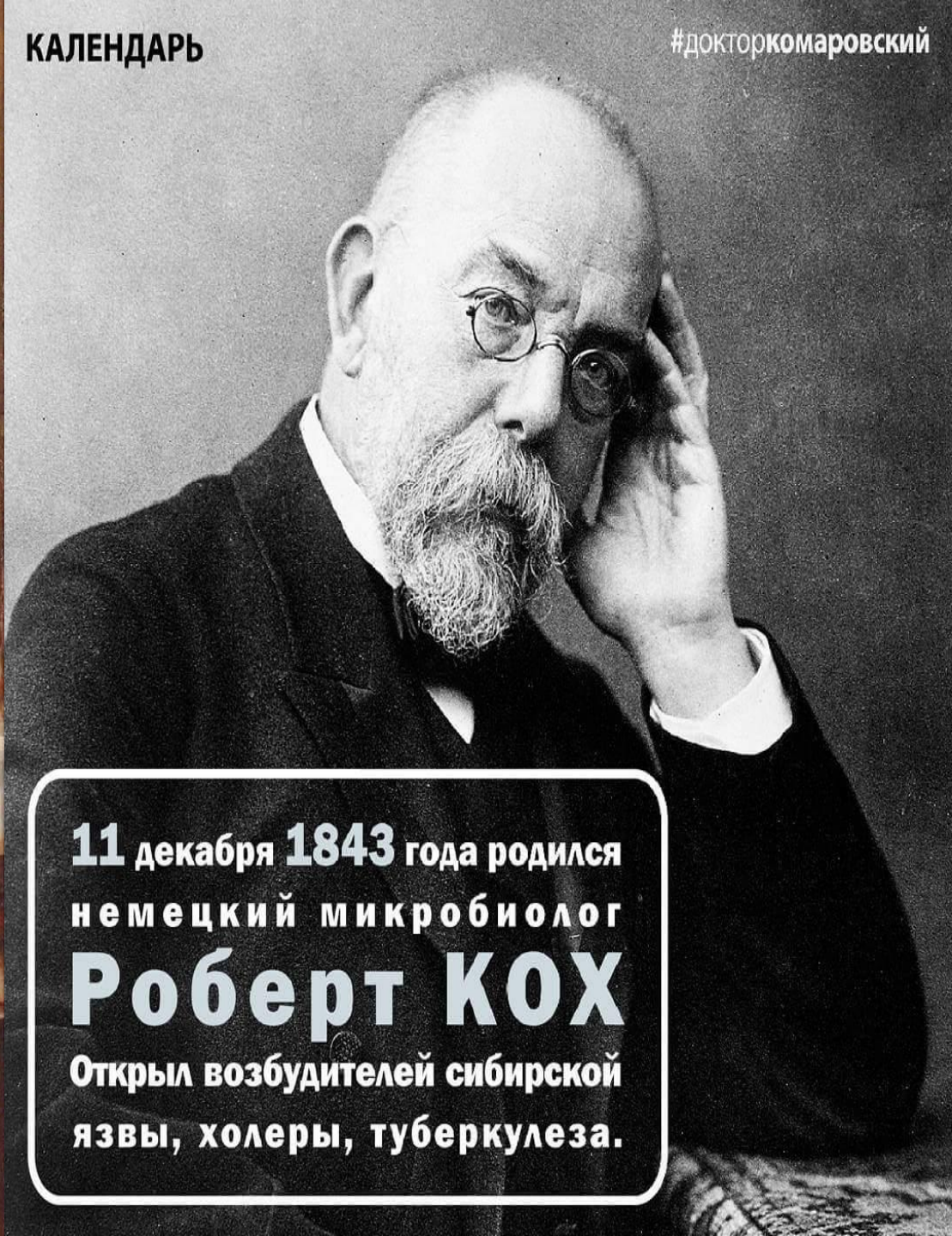
1. *Эмпирических знаний* (до изобретения микроскопов и их применения для изучения микромира).
 - ◉ Дж.Фракасторо (1546г.) предположил живую природу агентов инфекционных заболеваний- *contagium vivum*.
2. *Морфологический период* занял около двухсот лет.
 - ◉ Антони ван Левенгук в 1675г. впервые описал простейших, в 1683г.- основные формы бактерий. Несовершенство методов изучения микромира не способствовало быстрому накоплению научных знаний о микроорганизмах

3. *Физиологический период* (с 1875г.)- эпоха Л.Пастера и Р.Коха.

- ⦿ Л.Пастер- изучение микробиологических основ процессов брожения и гниения, открытие **анаэробных** микроорганизмов, разработка принципов **асептики**, методов **стерилизации** и получения **вакцин**.
- ⦿ Р.Кох- метод выделения **чистых культур** на питательных средах, способы окраски бактерий анилиновыми красителями, открытие возбудителей сибирской язвы, холеры, туберкулеза, совершенствование техники микроскопии.



**АСТНЫ ТЕ ЛЮДИ,
ОНЫМ ВСЁ ЯСНО."**



11 декабря 1843 года родился
немецкий микробиолог

Роберт КОХ

Открыл возбудителей сибирской
язвы, холеры, туберкулеза.

4. *Иммунологический период.*

- ◎ И.И.Мечников создал новую эпоху в микробиологии - учение о невосприимчивости (иммунитете), разработав теорию фагоцитоза и обосновав клеточную теорию иммунитета.
- ◎ Одновременно П.Эрлих разработал гуморальную теорию иммунитета. В последующей многолетней и плодотворной дискуссии между сторонниками фагоцитарной и гуморальной теорий были раскрыты многие механизмы иммунитета и родилась наука **иммунология**.

- ◎ 12 февраля 1892г. на заседании Российской академии наук Д.И.Ивановский сообщил, что возбудителем мозаичной болезни табака является фильтрующийся вирус. Эту дату можно считать днем рождения вирусологии, а Д.И.Ивановского- ее основоположником. Впоследствии оказалось, что вирусы вызывают заболевания не только растений, но и человека, животных и даже бактерий. Однако только после установления природы гена и генетического кода вирусы были отнесены к живой природе.

5. Следующим важным этапом в развитии микробиологии стало *открытие антибиотиков*.

◉ В 1929г. А.Флеминг открыл пенициллин и началась эра антибиотикотерапии, приведшая к революционному прогрессу медицины.

6. Современный *молекулярно- генетический этап* развития микробиологии, вирусологии и иммунологии начался во второй половине 20 века в связи с достижениями генетики и молекулярной биологии, созданием электронного микроскопа.

- *Медицинская микробиология и вирусология изучает возбудителей инфекционных болезней человека (их морфологию, физиологию, экологию, биологические и генетические характеристики), разрабатывает методы их культивирования и идентификации, специфические методы их диагностики, лечения и профилактики.*

ЗАДАЧИ МЕДИЦИНСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

1. Установление этиологической (причинной) роли микроорганизмов в норме и патологии.
2. Разработка методов диагностики, специфической профилактики и лечения инфекционных заболеваний, индикации (выявления) и идентификации (определения) возбудителей.
3. Бактериологический и вирусологический контроль окружающей среды, продуктов питания, соблюдения режима стерилизации и надзор за источниками инфекции в лечебных и детских учреждениях.
4. Контроль за чувствительностью микроорганизмов к антибиотикам и другим лечебным препаратам, состоянием микрофлоры организма человека.

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

1. Микроскопический
2. Микробиологический (бактериологический и вирусологический) - выделение чистой культуры и ее идентификация.
3. Биологический - заражение лабораторных животных (биопроба).
4. Иммунологический (серологический, аллергологический) - используется для выявления **антигенов** возбудителя или **антител** к ним.
5. Молекулярно- генетический - ДНК- и РНК- зонды, полимеразная цепная реакция (ПЦР) и многие другие.

СИСТЕМАТИКА И НОМЕНКЛАТУРА МИКРООРГАНИЗМОВ

Систематика- распределение микроорганизмов в соответствии с их происхождением и биологическим сходством.

Таксономия- наука о методах и принципах распределения (классификации) организмов в соответствии с их иерархией.

Номенклатура- название микроорганизмов в соответствии с международными правилами.

В МИРЕ МИКРОБОВ РАЗЛИЧАЮТ 3 ДОМЕНА

Неклеточные формы жизни	Прокариоты	Эукариоты
Вирусы Вироиды Бактериофаги Прионы	Бактерии	Грибы Простейшие

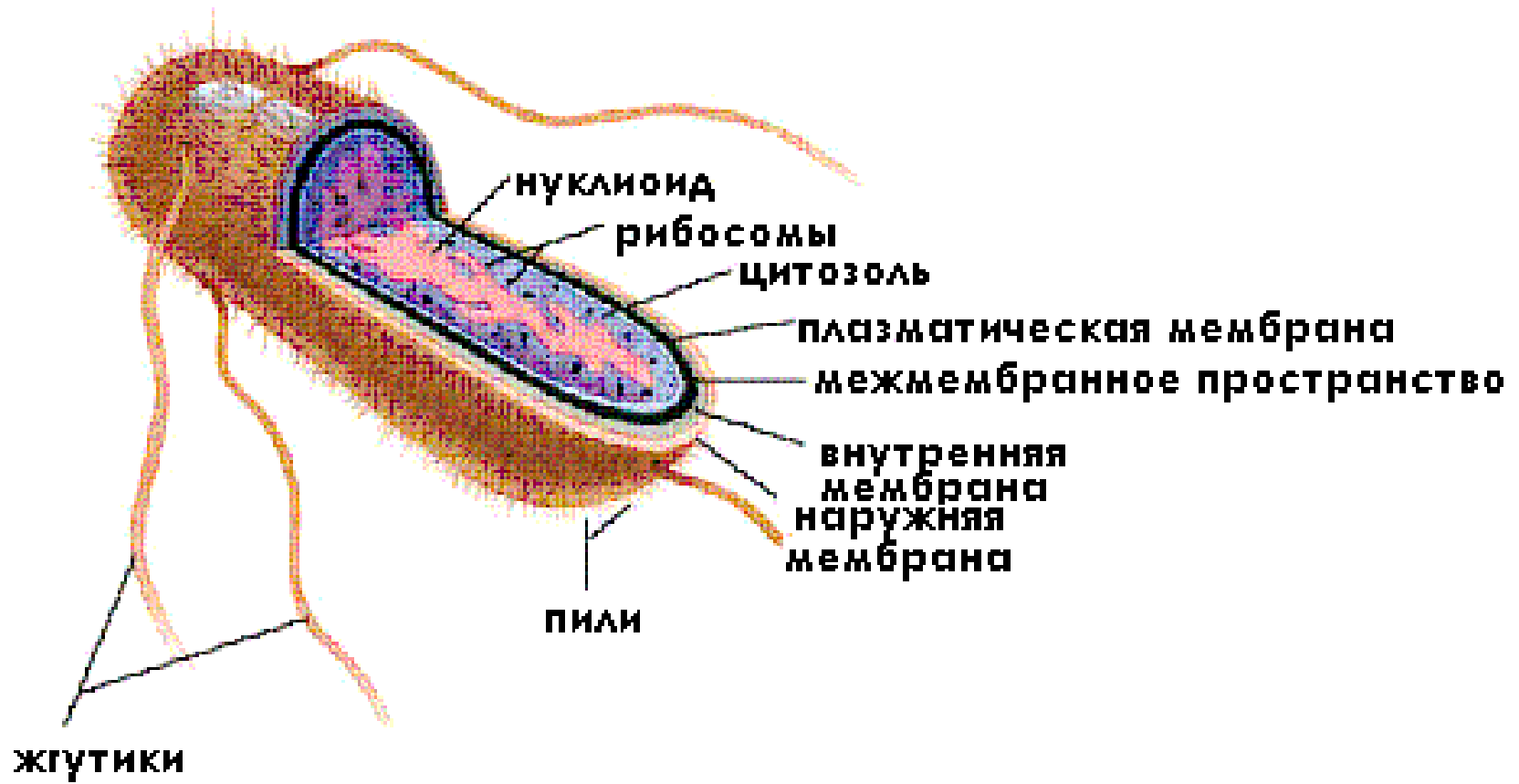
ЦАРСТВО BACTERIA

- Отделы Gracilicutes, Firmicutes, Tenericutes
- Классы Bacteria, Rickettsias, Spirochaetae, Mollicutes
- Порядки (-ales)
- Семейства (-ceae)
- Роды
- ВИДЫ

МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ

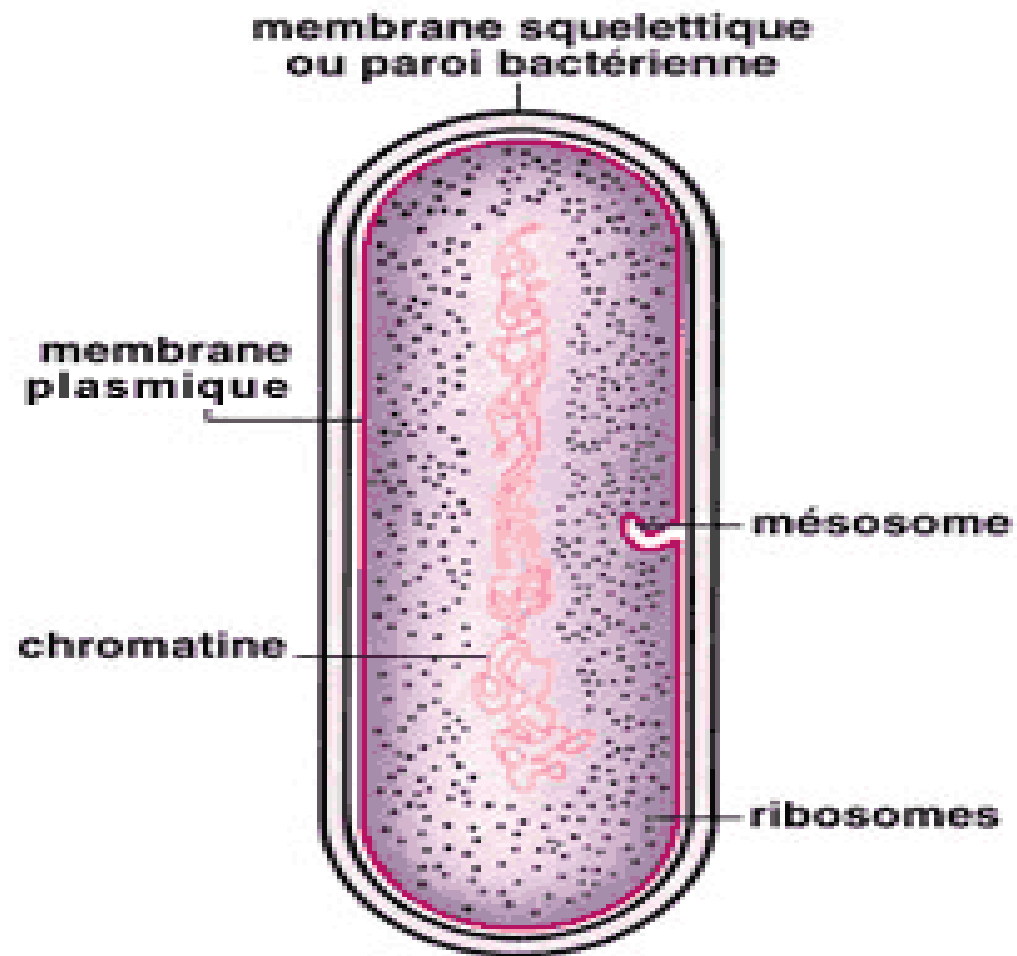
- Прокариоты отличаются от эукариот по ряду основных признаков.
 - Отсутствие истинного ядра (ядерной мембраны).
 - Отсутствие развитой эндоплазматической сети, аппарата Гольджи.
 - Отсутствие митохондрий, хлоропластов, лизосом.
 - Неспособность к эндоцитозу и фагоцитозу
 - Клеточное деление не связано с циклическими изменениями строения клетки (простое бинарное деление)
 - Значительно меньшие размеры (как правило). Большая часть бактерий имеет размеры 0,5-0,8 микрометров (мкм) × 2-3 мкм

СТРУКТУРА БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ



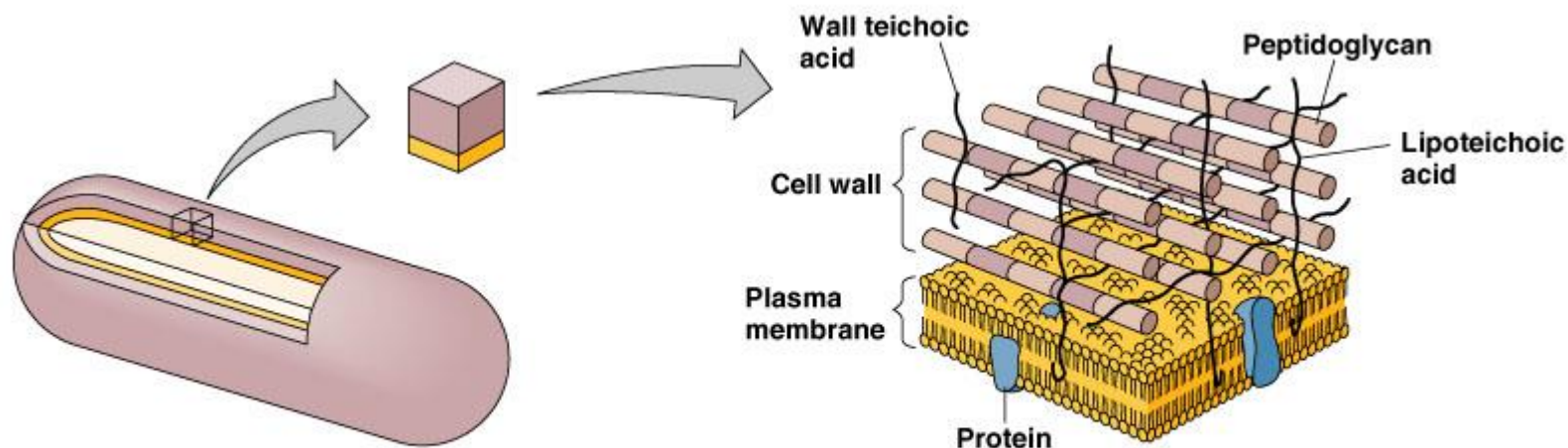
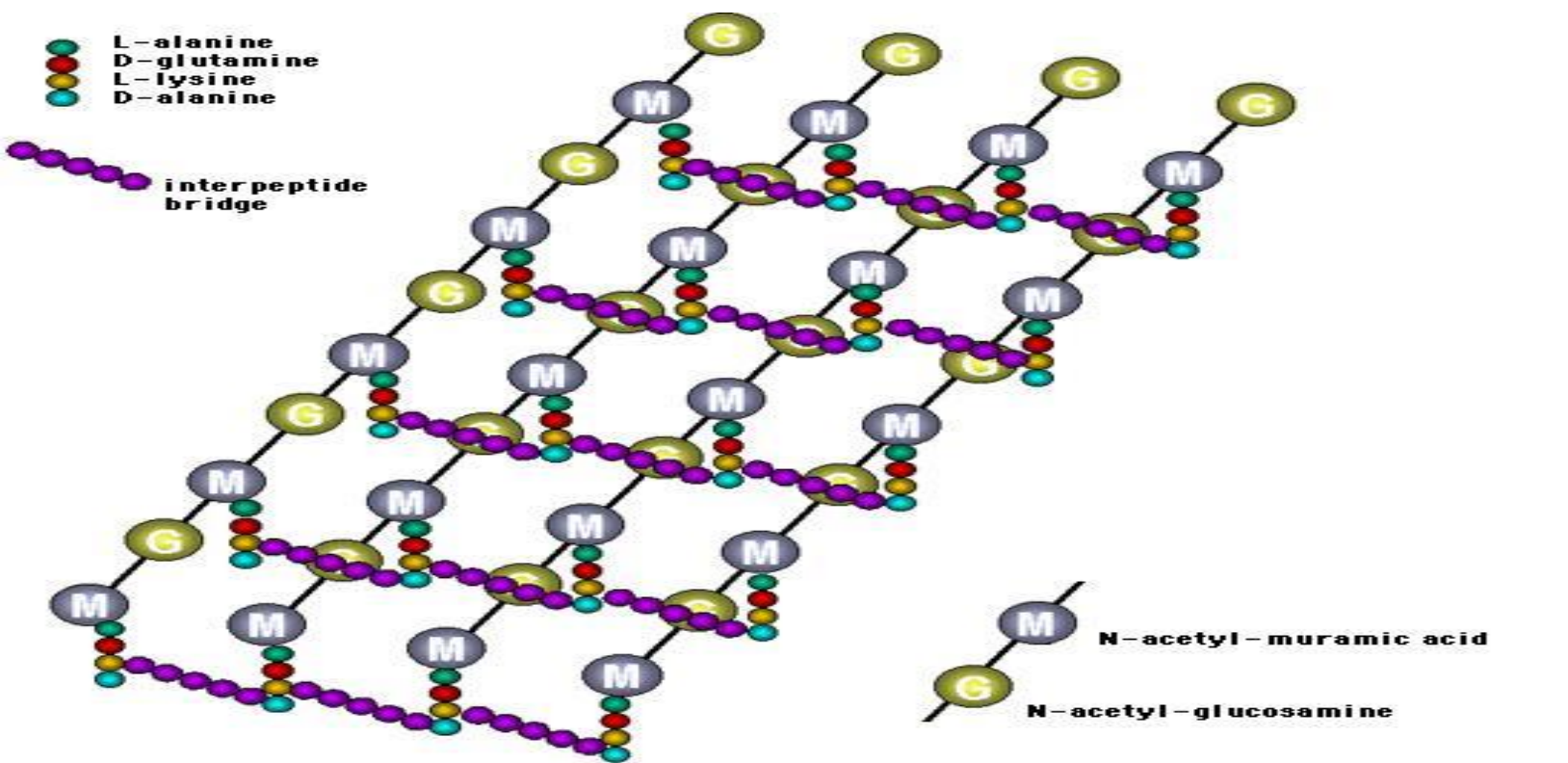
- 1. В центре бактериальной клетки находится нуклеоид- ядерное образование, представленное чаще всего одной хромосомой кольцевидной формы. Состоит из двухцепочечной нити ДНК. Нуклеоид не отделен от цитоплазмы ядерной мембраной.
- 2. Цитоплазма- сложная коллоидная система, содержащая различные включения метаболического происхождения (зерна волютина, гликогена, гранулезы и др.), рибосомы и другие элементы белоксинтезирующей системы, плазмиды (вненуклеоидное ДНК)

- ◎ **3. Цитоплазматическая мембрана**
ограничивает с наружной стороны цитоплазму, имеет трехслойное строение и выполняет ряд важнейших функций- барьерную (создает и поддерживает осмотическое давление), энергетическую (содержит многие ферментные системы- дыхательные, окислительно- восстановительные, осуществляет перенос электронов), транспортную (перенос различных веществ в клетку и из клетки).
- ◎ **мезосомы** (образуются в результате инвагинации цитоплазматической мембраны в цитоплазму, участвуют в энергетическом обмене, спорообразовании, формировании межклеточной перегородки при делении).



КЛЕТОЧНАЯ СТЕНКА

- Клеточная стенка представляет собой внешнюю структуру бактерий, главным компонентом которой является **пептидогликан (муреин, мукопептид)**.
- Пептидогликан является структурным полимером, состоящим из чередующихся субъединиц N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединённых гликозидными связями.



(b) Gram-positive cell wall

ТОЛСТОСТЕННЫЕ (FIRMICUTES)

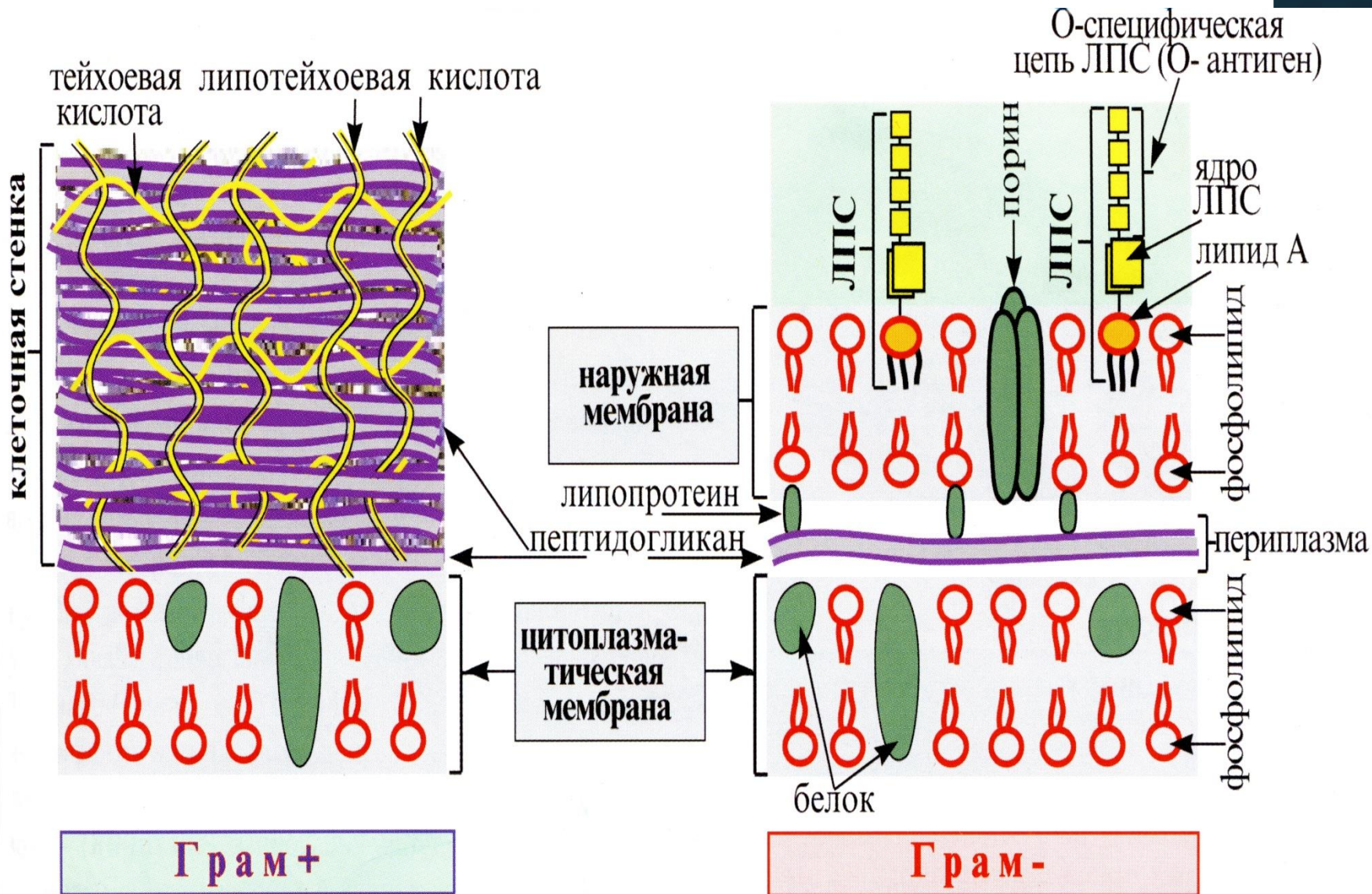
- Толстостенные имеют мощную КС, толщиной от 50 до 120 нм, на 90-95% состоящую из пептидогликана. У данной группы бактерий пептидогликан образует вокруг клетки до 10 слоёв и представляет собой единую пористую или ячеистую структуру. В ячейках КС содержатся тейхоевые кислоты (представляют собой цепи из 8-50 остатков глицерола и рибитола, соединенных фосфатными мостиками)

ТОНКОСТЕННЫЕ (GRACILICUTES)

- Тонкостенные бактерии имеют более тонкую (15-20 нм), но и более сложно устроенную КС. У таких бактерий снаружи от ЦПМ имеется периплазматическое пространство, затем небольшая прослойка пептидогликана (2-3 слоя и, соответственно, 5-10% от всей массы КС) без тейхоевых кислот. Снаружи от пептидогликана находится наружная мембрана (аналог ЦПМ), в состав которой входят липиды, белки, полисахариды, липопротеиды. Главное же отличие КС у данной группы бактерий - наличие ЛПС, встроенного в наружную мембрану.

ЛИПОПОЛИСАХАРИДНЫЙ КОМПЛЕКС (ЛПС)

- Липоидный комплекс т.н. липид А заякорен в наружной мембране и обуславливает токсичность (воспалительные реакции, лихорадка, эндотоксиновый шок - **эндотоксин**). От липида А отходит ядро или стержневая часть ЛПС. О-специфическая боковая цепь, отходящая от стержневой части ЛПС, или полисахаридный компонент, отвечает за антигенспецифичность (О-соматический антиген).



- В конце XIX века датским учёным Х. Грамом была предложена дифференциальная окраска. Принцип метода заключается в поэтапном использовании красителей (генциан фиолетовый и фуксин), благодаря которому толстостенные бактерии окрашиваются в сине-фиолетовый цвет и называются грамположительными (грампозитивными), а тонкостенные окрашиваются в красный цвет и называются грамотрицательными (грамнегативными).

- Для микобактерий, нокардий и актиномицетов характерна усложненная структура клеточной стенки. Основу у них, так же как и у грамположительных бактерий, составляет муреиновый каркас, однако последний связан с полисахаридами и липидами. Липиды представлены миколовыми кислотами, гликолипидами и восками, которые придают клеточной поверхности гидрофобность. Гидрофобность, с одной стороны, делает клетку устойчивой к действию различных химических веществ (такие бактерии называются кислото-спирто-щёлочестойчивыми), с другой - тормозит обмен клетки с окружающей средой и замедляет ее рост.

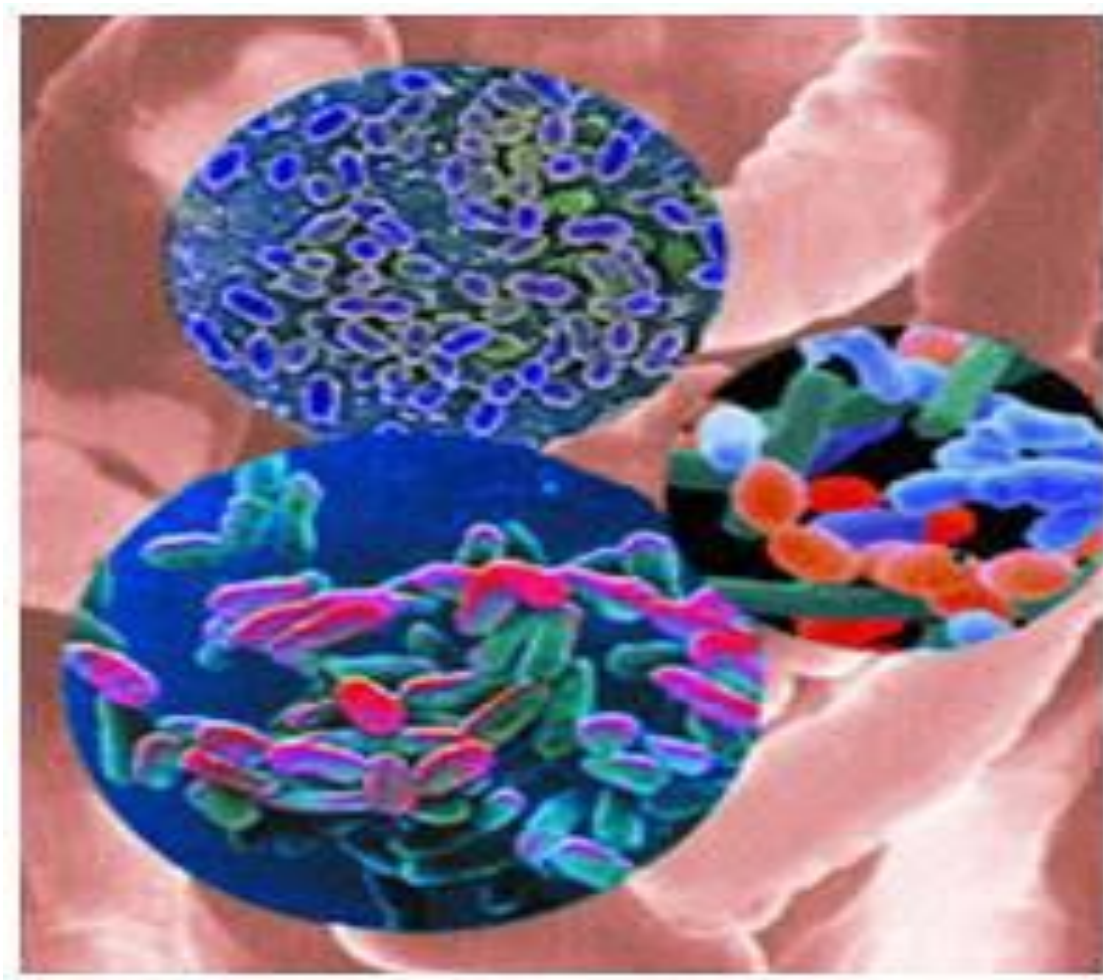
- Метод окраски: по Цилю-Нильсену

- При нарушении синтеза КС под влиянием лизоцима, пенициллина, защитных факторов организма и некоторых соединений образуются клетки с измененной формой (в основном, шаровидной), частично или полностью лишённые КС (*сферопласты*, *протопласты*). Такие бактерии называются *L-формы*. Они способны размножаться, сохранять все биологические свойства, а при прекращении воздействия на них провоцирующих факторов восстанавливают КС, т.е. реверсируют в исходные формы. Этим свойством обладают многие возбудители заболеваний.

БАКТЕРИИ, НЕ ИМЕЮЩИЕ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ

- есть возбудители, не имеющие КС. Это *микоплазмы* и *уреаплазмы*. Они относятся к отделу *Tenericutes*, классу *Mollicutes*, порядку *Mycoplasmatales*. Это самые мелкие свободноживущие полиморфные бактерии, размером 125-150 нм. Клетки окружены капсулоподобным слоем, под которым находится ЦПМ, содержащая значительное количество холестерина, который стабилизирует её структуру.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ



НЕОБЯЗАТЕЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

- Жгутики. Подвижные бактерии могут быть скользящие (передвигаются по твердой поверхности в результате волнообразных сокращений) или плавающие, передвигающиеся за счет нитевидных спирально изогнутых белковых (флагеллиновых по химическому составу) образований- жгутиков.
- Способность к целенаправленному движению (хемотаксис, аэротаксис, фототаксис) у бактерий генетически детерминирована.

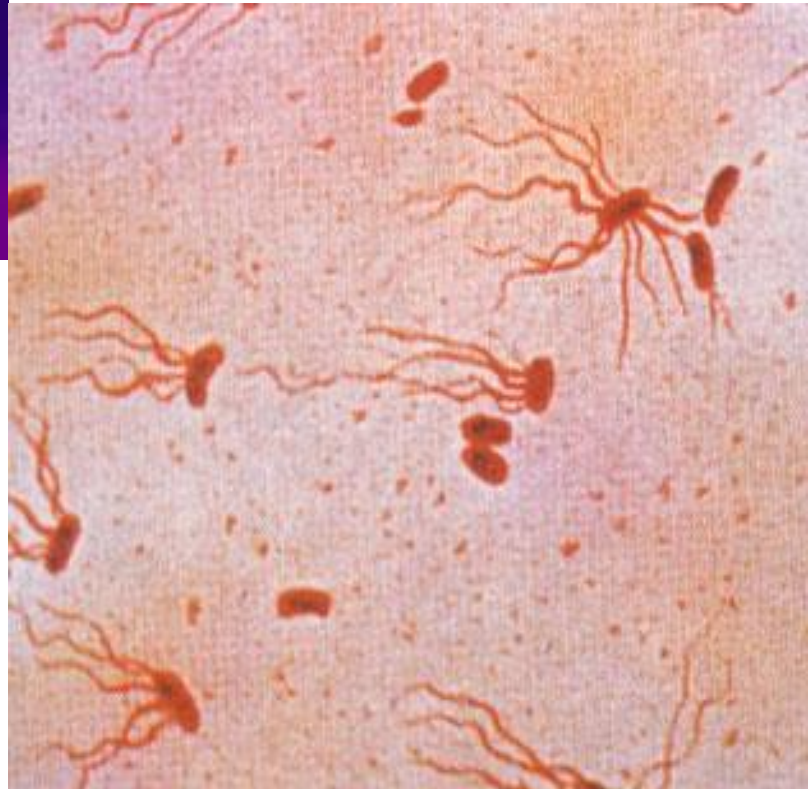
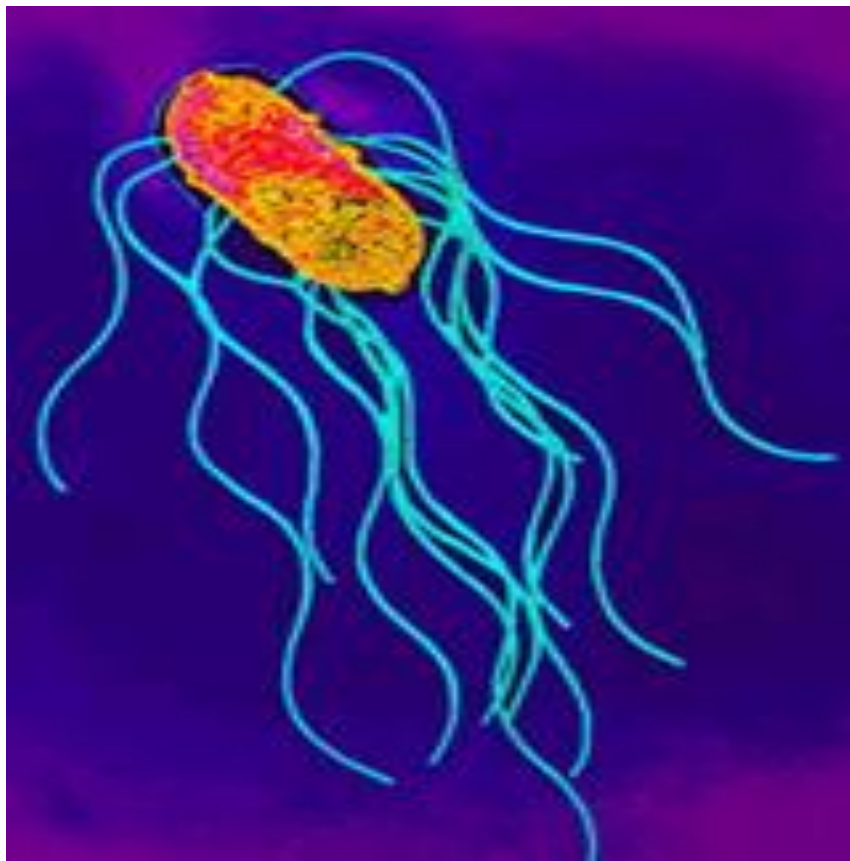
● По расположению и количеству жгутиков выделяют ряд форм бактерий.

1. Монотрихи- имеют один полярный жгутик.

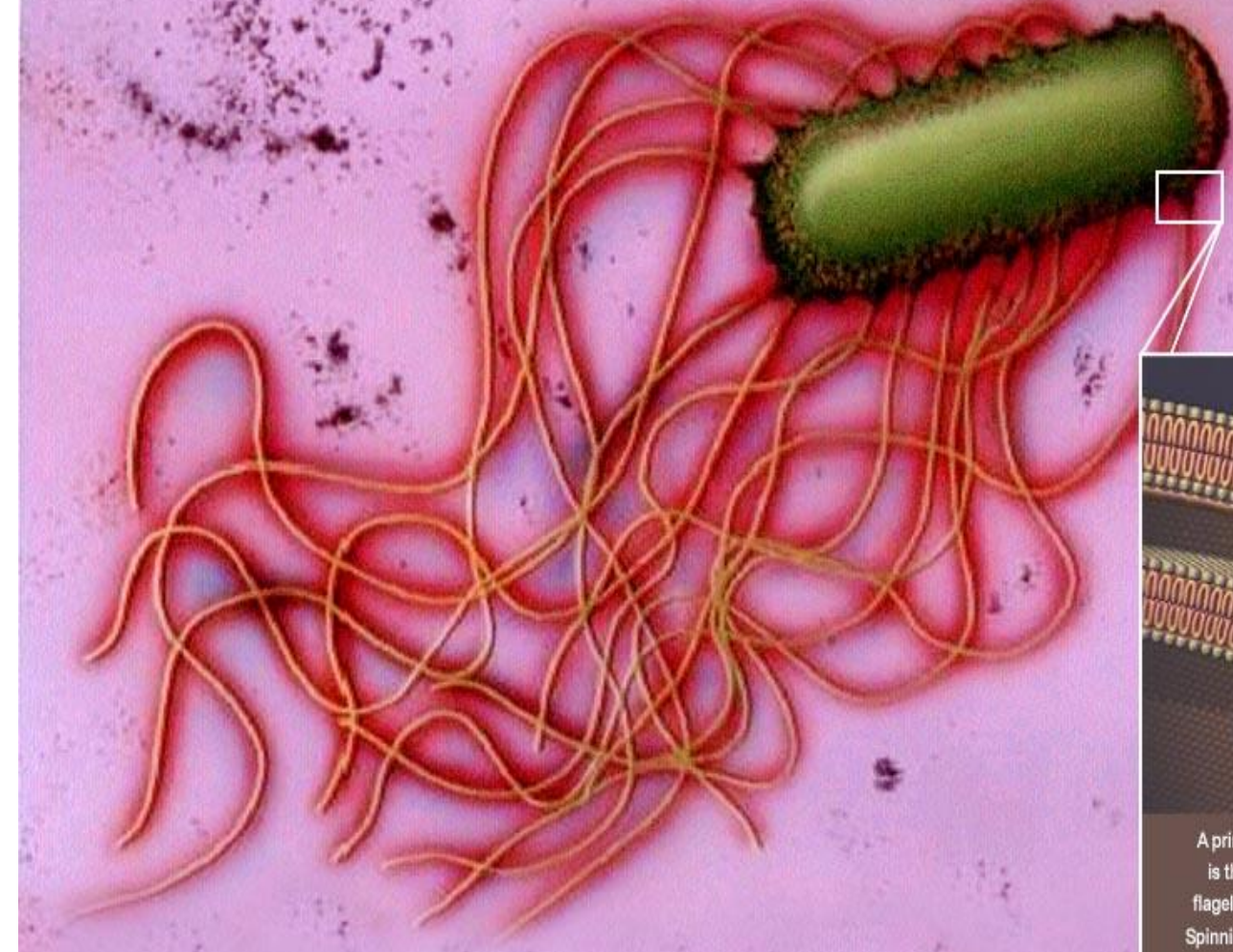
2. Лофотрихи- имеют полярно расположенный пучок жгутиков.

3. Амфитрихи- имеют жгутики по диаметрально противоположным полюсам.

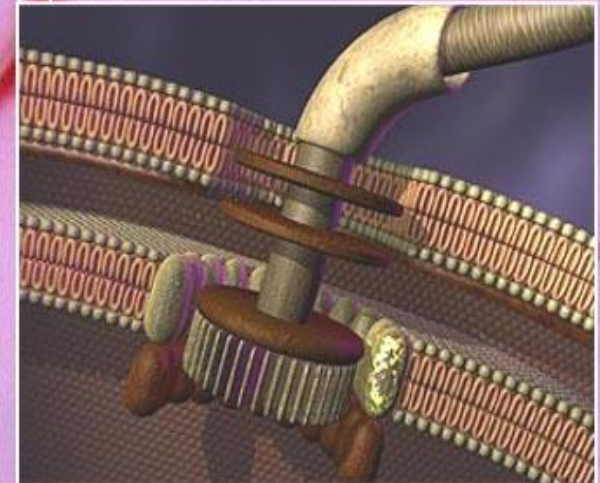
4. Перитрихи- имеют жгутики по всему периметру бактериальной клетки.



- Жгутики представляют собой тонкие нити, берущие начало от ЦПМ. Толщина жгутиков 12-20 нм, длина 3-15 мкм. Они состоят из 3-х частей: спиралевидной нити, крюка и базального тельца, содержащего стержень со специальными дисками (1 пара дисков у грам(+) и 2 пары - у грам (-) бактерий).
- Дисками жгутики прикреплены к ЦПМ и КС. В качестве источника энергии используется разность протонных потенциалов на ЦПМ.
- Жгутики состоят из белка - флагеллина, являющегося антигеном (H-антиген). Субъединицы флагеллина закручены в виде спирали.

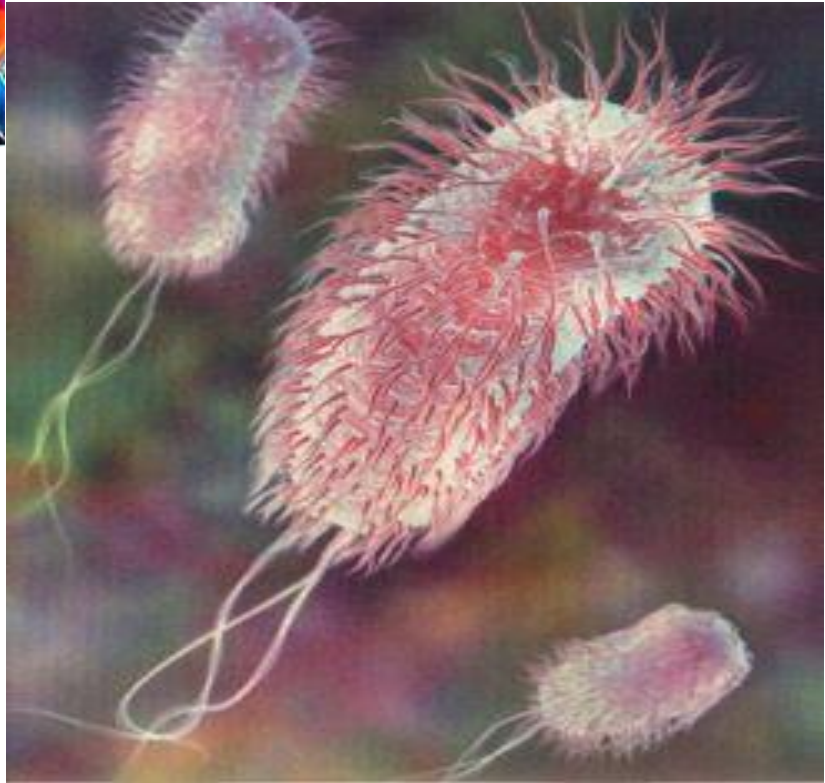
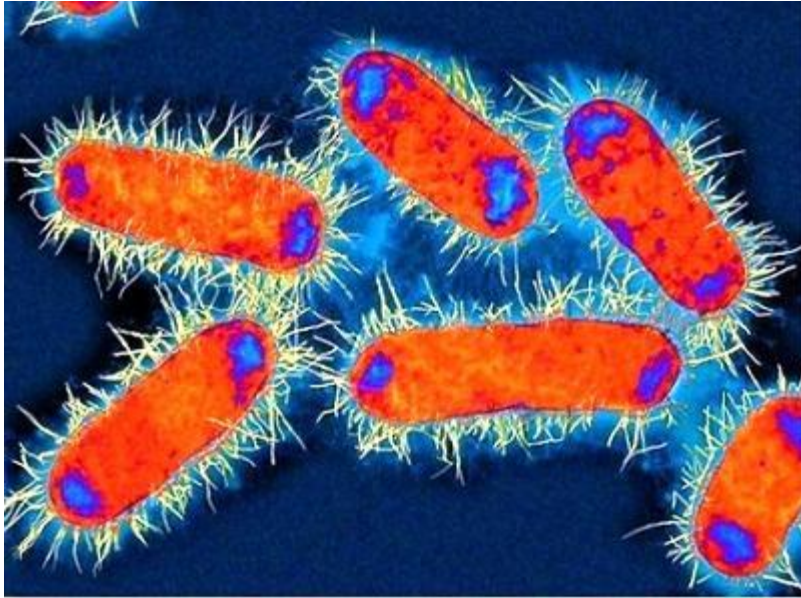


In the "Origins of Species" Charles Darwin wrote:
"If it could be demonstrated that any complex organ
existed which could not possibly have been formed by
numerous, successive, slight modifications, my theory
would absolutely break down."
[Sixth Edition, New York University Press, page 154]



A prime example of Michael Behe's "irreducible complexity"
is the bacteria flagellum. With over 40 essential parts, the
flagellum is a rotary motor used to propel a bacteria in liquid.
Spinning at 17,000 rpms, the motor is acid driven, liquid cooled
and self-replicating.

- ◉ Ворсинки или пили (фимбрии) - нитевидные образования, более тонкие и короткие, чем жгутики. Состоят из белка пилина
- ◉ Пили общего типа (несколько сотен на клетку) отвечают за адгезию к субстрату, питание и водно-солевой обмен
- ◉ Половые пили (1-3 на клетку) осуществляют передачу генетической информации между бактериями
- ◉ Пили IV типа располагаются по полюсам клетки, участвуют в образовании микробных сообществ
- ◉ Многие пили являются рецепторами для бактериофагов



- ◎ Капсула, микрокапсула, слизь.

- ◎ Капсула - слизистая структура толщиной более 0,2 мкм, прочно связанная с КС и имеющая четко очерченные внешние границы. Различают полисахаридные и белковые капсулы. Являются защитной структурой (прежде всего от высыхания), у ряда микробов- фактором патогенности, препятствует фагоцитозу, ингибирует первые этапы защитных реакций- распознавание и поглощение.

Капсула гидрофильна и антигенна.

- ◎ Многие бактерии образуют микрокапсулу - слизистое образование толщиной менее 0,2 мкм, выявляемое лишь при электронной микроскопии

- У *сапрофитов* капсулы образуются во внешней среде, у патогенов - чаще в организме хозяина. Существует ряд методов окраски капсул в зависимости от их химического состава (наиболее распространенная окраска - по Бурри-Гинсу)
- От капсулы следует отличать слизь - мукоидные экзополисахариды, не имеющие четких границ. Они растворимы в воде, участвуют в адгезии.

**Клеточная
стенка**

Нуклеонд

Капсула

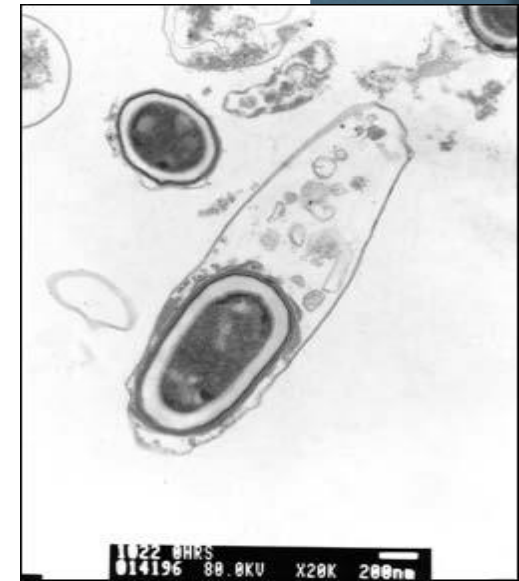


СПОРЫ И СПОРООБРАЗОВАНИЕ

- *Спорообразование*- способ сохранения определенных видов бактерий (грамположительных) в неблагоприятных условиях среды. *Эндоспоры* образуются в цитоплазме, представляют собой клетки с низкой метаболической активностью и высокой устойчивостью (*резистентностью*) к высушиванию, действию химических факторов, высокой температуры и других неблагоприятных факторов окружающей среды.

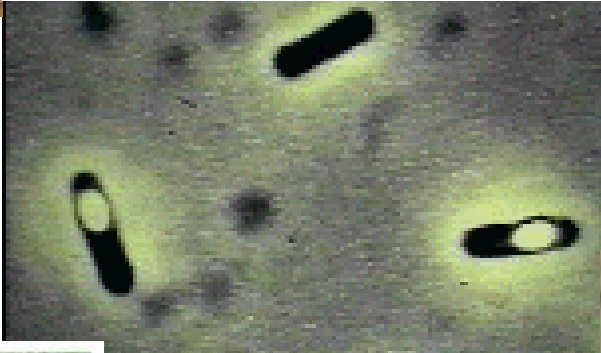
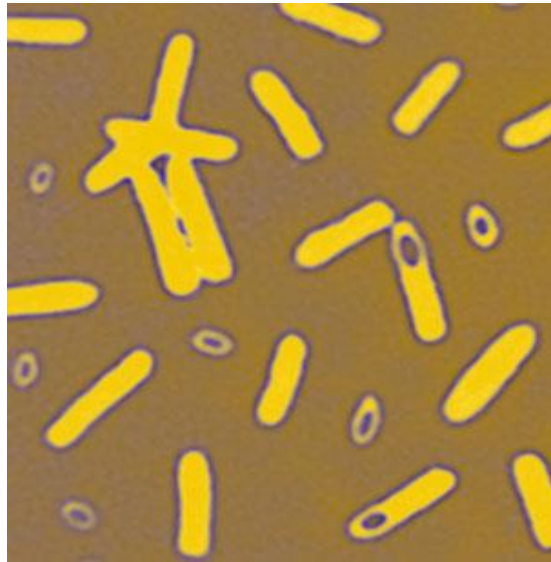
- Процесс спорообразования (споруляция) проходит ряд стадий, в течение которых часть цитоплазмы и хромосома вегетативной клетки отделяются, окружаясь растущей ЦПМ, - образуется *проспора*
- В протопласте проспоры находятся нуклеоид, белоксинтезирующая система и система получения энергии, основанная на гликолизе. Проспору окружают две ЦПМ. Слой, окружающий внутреннюю мембрану споры, называется *стенкой споры*, он состоит из пептидогликана и является главным источником КС при прорастании споры.

- Между наружной мембраной и стенкой споры формируется толстый слой, состоящий из пептидогликана, имеющего много сшивок, - *кортекс*.
- Кнаружи от внешней ЦПМ расположена оболочка споры, состоящая из кератиноподобных белков. Высокая резистентность связана с большим содержанием *кальцевой соли дипиколиновой кислоты* в оболочке спор.



В благоприятных условиях споры прорастают, проходя три последовательные стадии:

- ⦿ Активация - готовность к прорастанию. При темп. 60-80 град. Спора активируется.
- ⦿ Инициация - длится несколько минут
- ⦿ Стадия вырастания характеризуется быстрым ростом, сопровождающимся разрушением оболочки и выходом проростка. Из одной споры образуется одна бактерия.



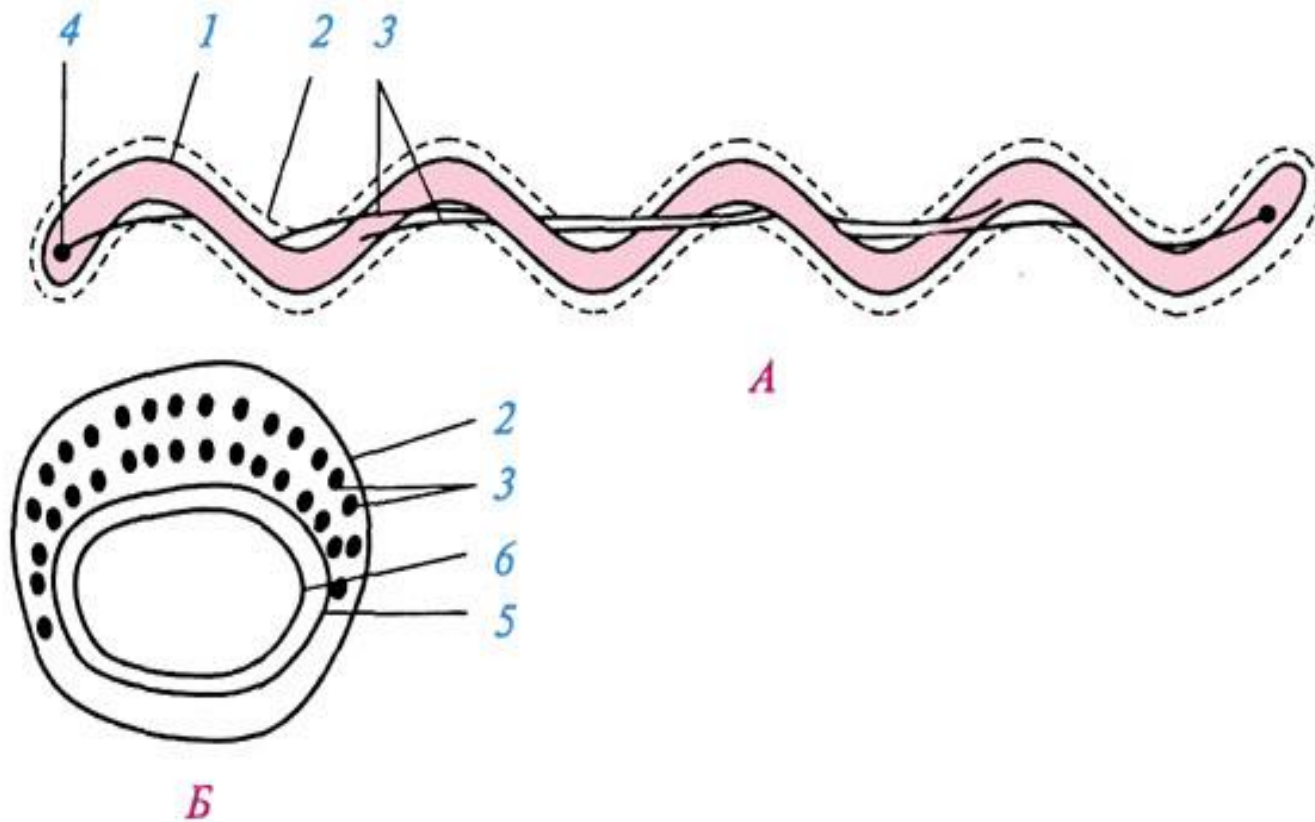
ФОРМЫ БАКТЕРИЙ

- ◉ Шаровидные (кокки)
- ◉ Палочковидные (палочки, нитевидные бактерии и вибрионы)
- ◉ Спиралевидные (извитые)
 - Спириллы
 - Спирохеты

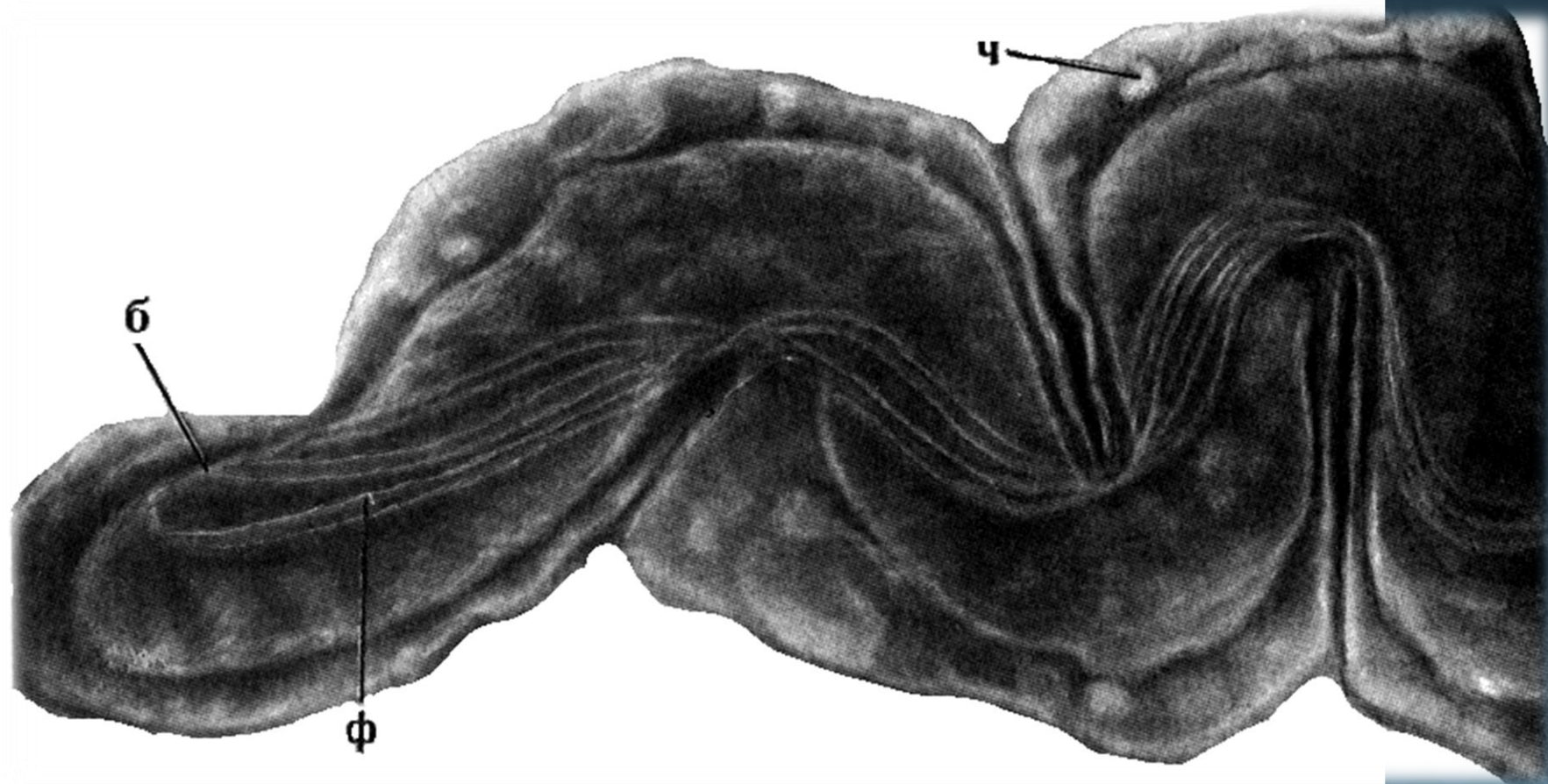
МОРФОЛОГИЯ СПИРОХЕТ

КЛАСС SPIROSCHAETAE

ПОРЯДОК SPIROSCHAETALES

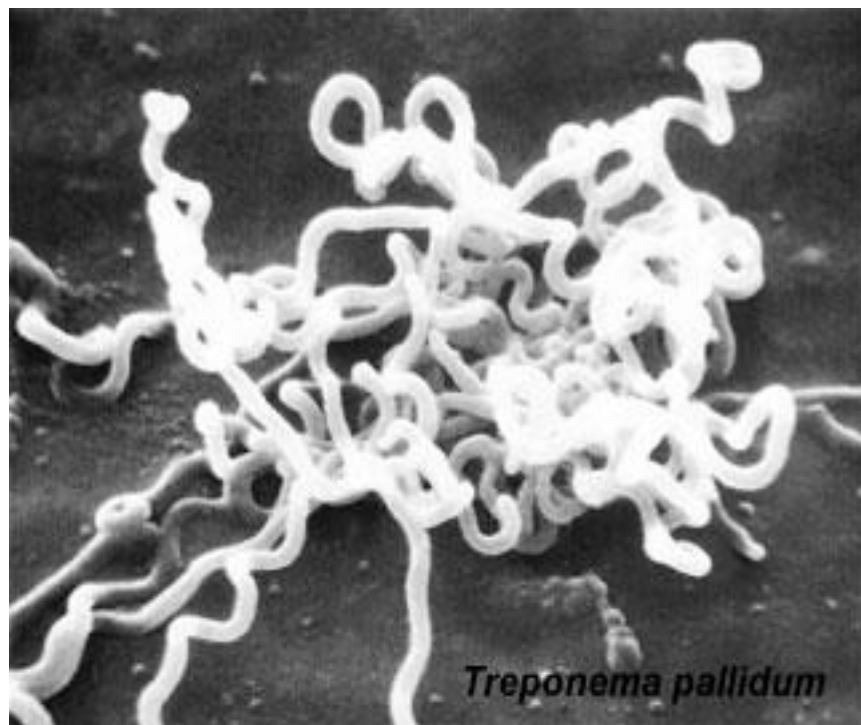


ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ. УВЕЛИЧЕНИЕ 131000.



ч - чехол; б - блефаропласт; ф - фибриллы

ТРЕПОНЕМЫ В ЭЛЕКТРОННОМ МИКРОСКОПЕ



МОРФОЛОГИЯ ХЛАМИДИИ

КЛАСС RICKETTSIAS

ПОРЯДОК RICKETTSIALES

- Хламидии - мелкие грамотрицательные прокариоты шаровидной или овоидной формы, не образуют спор, неподвижны, не имеют капсулы. Являются облигатными внутриклеточными паразитами.

Хламидии существуют в двух формах:

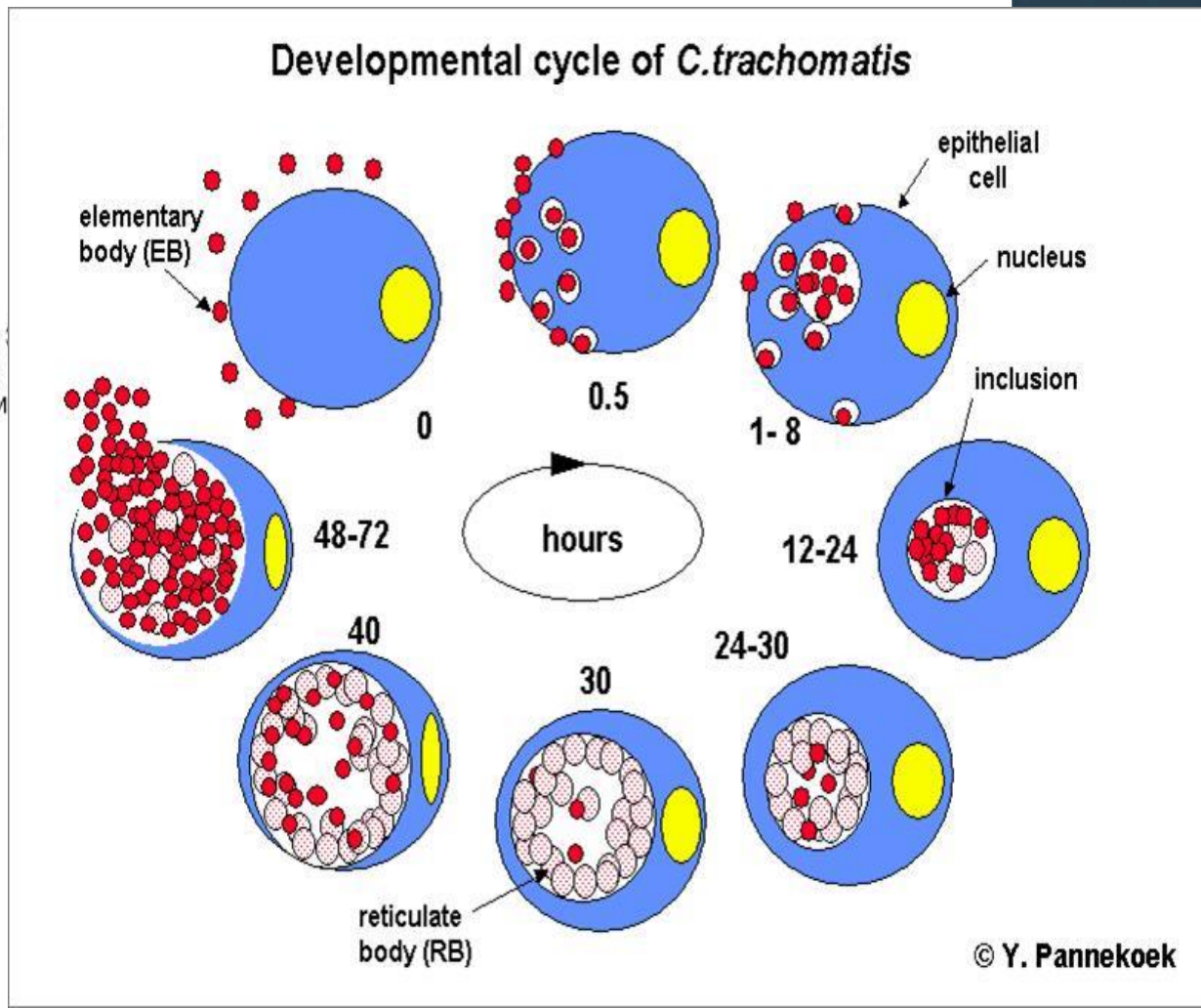
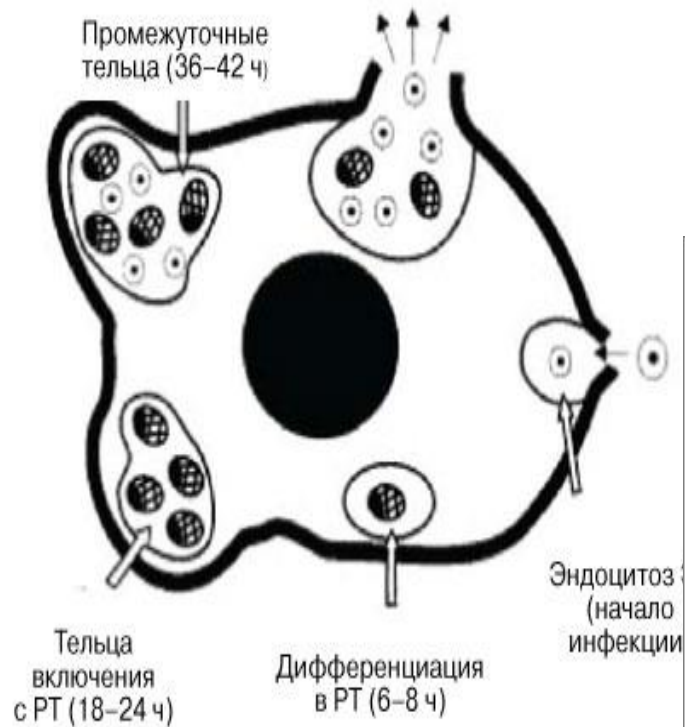
- Элементарное тельце (0,2-0,3 мкм) - внеклеточная инфекционная форма хламидий, ответственное за процесс прикрепления к клетке-мишени и проникновение в них.
- Ретикулярное тельце (0,8-1,5 мкм)- внутриклеточная метаболически активная форма

ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ХЛАМИДИЙ -

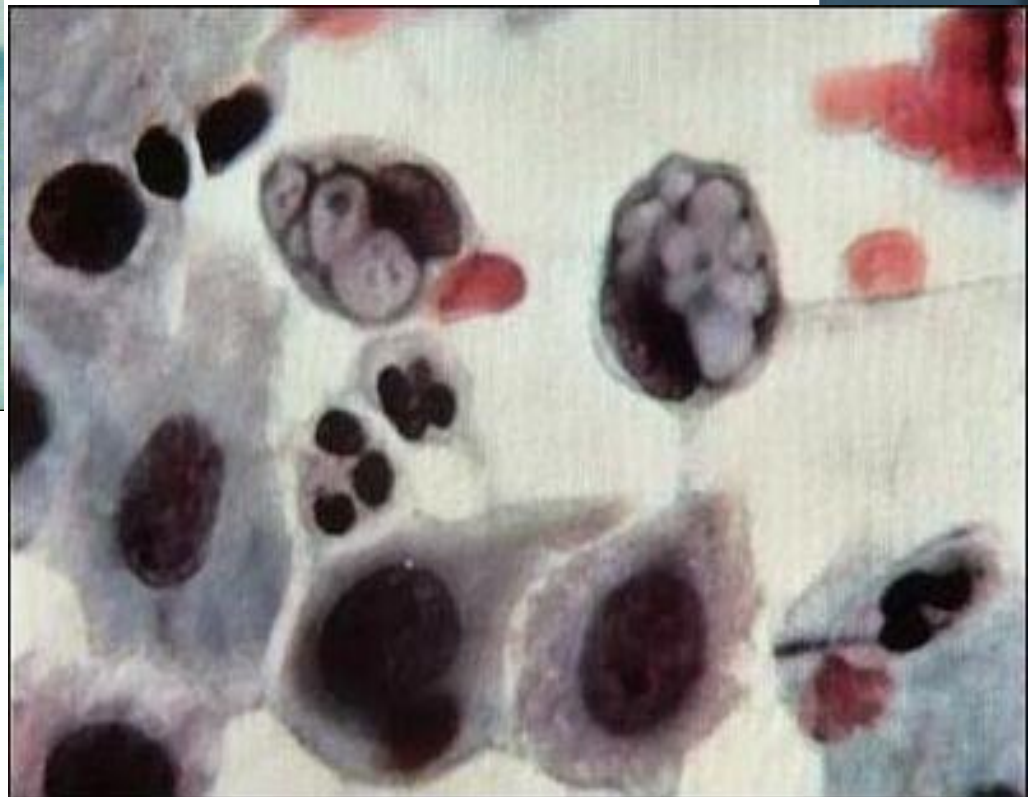
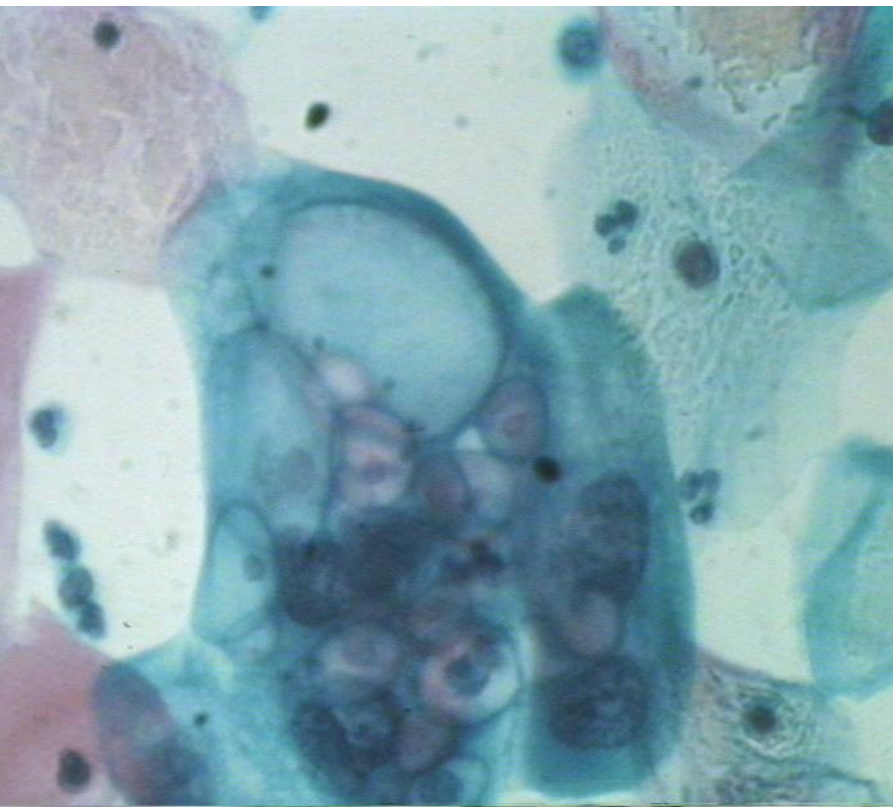
(ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ 48-72 ЧАСА)

- 1. Адсорбция ЭТ на мембране клетки мишени и внедрение по типу эндоцитоза с образованием фагоцитарной вакуоли (7-10 часов).
- 2. Преобразование ЭТ в более крупное РТ, которое многократно делится бинарно, образуя хламидийные включения, окруженные мембраной клетки-хозяина (18-24 часа).
- 3. Созревание хламидий - образование промежуточных телец и трансформация РТ в ЭТ (36-42 часа).
- 4. Выход ЭТ из разрушенной клетки.
- 5. Проникновение ЭТ в новые клетки и начало нового цикла развития

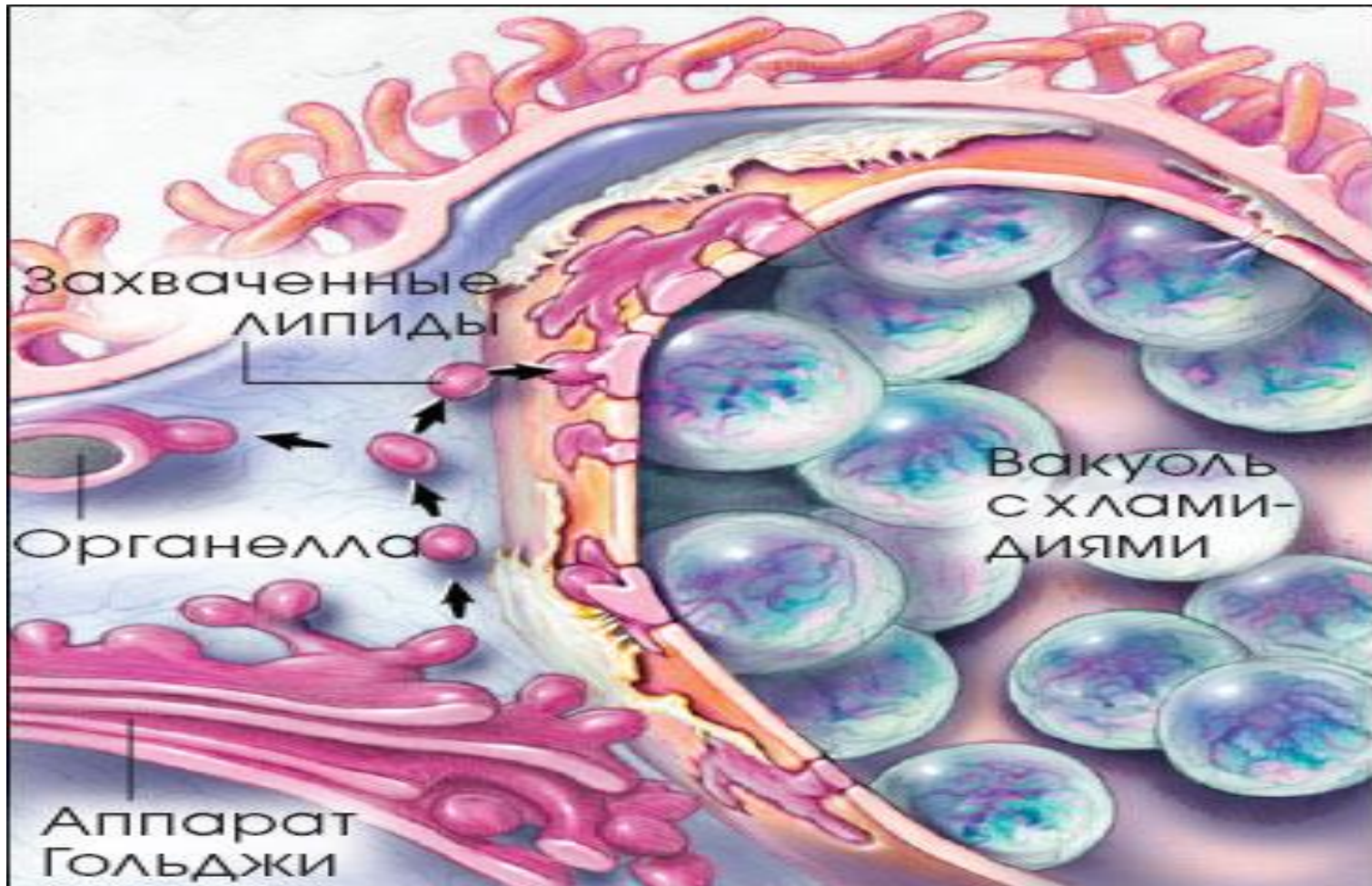
ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ХЛАМИДИЙ



МИКРОКОЛОНИИ ХЛАМИДИЙ В КЛЕТКЕ



ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ ВКЛЮЧЕНИЕ, СОДЕРЖАЩЕЕ РАЗМНОЖАЮЩИЕСЯ ХЛАМИДИИ



ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОСКОПИЧЕСКОГО МЕТОДА

- Метод исследования с использованием приборов для микроскопии. Определяют форму, размеры, взаиморасположение микроорганизмов, их структуру, способность окрашиваться определенными красителями.
- К основным способам микроскопии можно отнести *световую* микроскопию (с разновидностями- иммерсионная, темнопольная, фазово - контрастная, люминесцентная и др.) и *электронную* микроскопию.

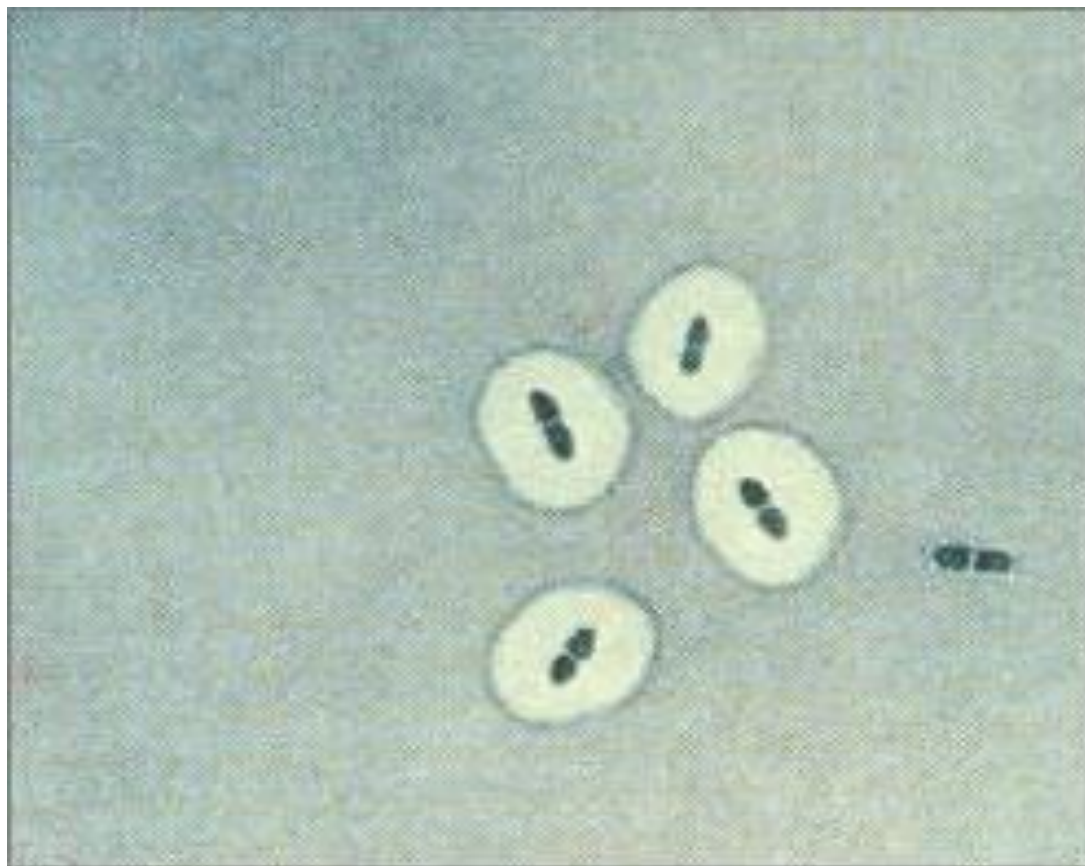
ФАЗОВО-КОНТРАСТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

При прохождении пучка света через неокрашенный объект изменяется лишь фаза колебания световой волны, что не воспринимается человеческим глазом. Чтобы изображение стало контрастным необходимо превратить фазовые изменения световой волны в видимые амплитудные. Это достигается с помощью фазовоконтрастного конденсора и фазового объектива.

Фазовоконтрастный конденсор представляет собой обычный объектив с револьвером и набором кольцевых диафрагм для каждого объектива. Фазовый объектив снабжен фазовой пластинкой, которую получают нанесением солей редкоземельных элементов на объектив. Изображение кольцевой диафрагмы совпадает с кольцом фазовой пластинки соответствующего объектива.

Фазовоконтрастная микроскопия значительно повышает контрастность объекта и используется для изучения нативных препаратов.

ФАЗОВО-КОНТРАСТНАЯ МИКРОСКОПИЯ



ТЕМНОПОЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Лучи освещают объект не снизу, а сбоку и не попадают в глаза наблюдателя, поле зрения остается темным, а объект на его фоне оказывается светящимся. Это достигается с помощью специального конденсора (параболоид), или обычного конденсора, прикрытого в центре кружком черной бумаги.

Препараты для темнопольной микроскопии готовят по типу раздавленной капли. Исследуемый материал (бактериальная культура в физиологическом растворе) наносят на предметное стекло, которое покрывают покровным. Капля материала заполняет все пространство между покровным и предметным стеклом, образуя ровный слой. Темнопольная микроскопия используется для изучения живых неокрашенных микроорганизмов.

ТЕМНОПОЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Syphilis Curriculum

Pathogenesis

Treponema pallidum on darkfield microscopy



Source: CDC/NCHSTP/Division of STD Prevention, STD Clinical Slides

2



ЛЮМИНИСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Люминесцентная микроскопия основана на способности некоторых веществ под влиянием падающего на них света испускать лучи с другой (обычно большей) длиной волны (флюоресцировать). Такие вещества называют флюорохромами (акридиновый желтый, ауромин, родамин и др.). Объект, обработанный флюорохромом, при освещении ультрафиолетовыми лучами приобретает яркий цвет в темном поле зрения.

Основной частью люминесцентного микроскопа является осветитель, имеющий лампу ультрафиолетового цвета и систему фильтров к нему. Очень важно использование нефлюоресцентного иммерсионного масла.

Люминесцентная микроскопия в практической микробиологии используется для индикации и идентификации возбудителей инфекционных заболеваний с помощью реакции иммунофлюоресценции (РИФ).

ЛЮМИНИСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

