

# Морфология бактерий. Культуральные и тинкториальные свойства.

Преподаватель Мустафаева А  
Студент Аблаева Р Тер 801



- **Морфологические и тинкториальные признаки** бактерий изучают при микроскопическом исследовании мазков, окрашенных разными методами, и нативных препаратов.

**Культуральные свойства** характеризуются питательными потребностями, условиями и типом роста бактерий на плотных и жидких питательных средах. Они устанавливаются по морфологии колоний и особенностям роста культуры.

**Биохимические признаки** бактерий определяются набором конститутивных и индуцибельных ферментов, присущих определенному роду, виду, варианту. В бактериологической практике таксономическое значение имеют чаще всего сахаролитические и протеолитические ферменты бактерий, которые определяют на дифференциально-диагностических средах.



# Описание

- **Бактерии**—одноклеточные микроорганизмы. Они имеют разнообразную форму и довольно сложную структуру, определяющую многообразие их функциональной деятельности. Для бактерий характерны четыре основные формы: сферическая (шаровидная), цилиндрическая (палочковидная), извитая и нитевидная
- **Бактерии шаровидной формы** —кокки—в зависимости от плоскости деления и расположения отдельных особей подразделяются на микрококки (отдельно лежащие кокки), диплококки (парные кокки), стрептококки (цепочки кокков), стафилококки (имеющие вид виноградных гроздьев), тетракокки (образования из четырех кокков) и сарцины (пакеты из 8 или 16 кокков).
- **Палочковидные бактерии** располагаются в виде одиночных клеток, дипло- или стрептобактерий.
- **Извитые формы** бактерий—вибрионы и спириллы, а также спирохеты. Вибрионы имеют вид слегка изогнутых палочек, спириллы — извитую форму с несколькими спиральными завитками.

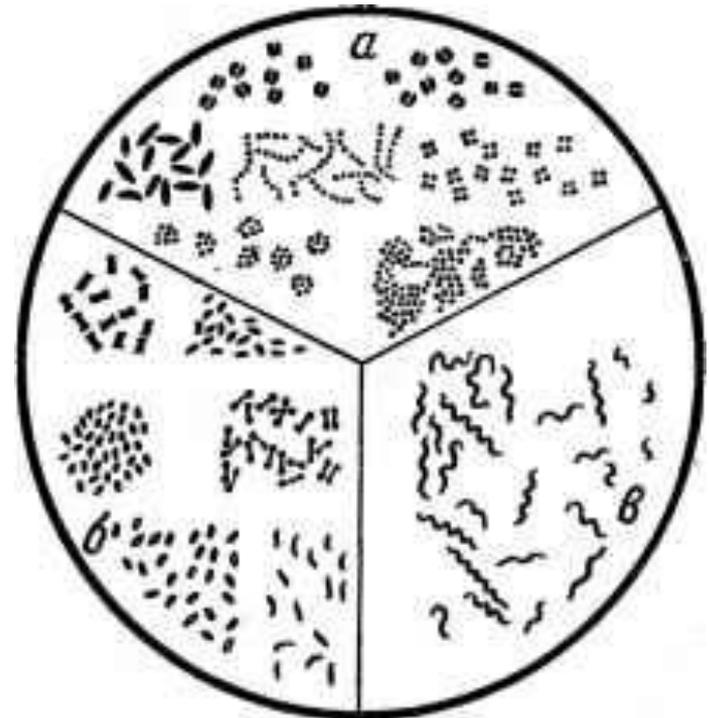


Рис. 11. Формы бактерий.  
а — шаровидные; б — палочковидные; в — извитые

- Размеры бактерий колеблются от 0,1 до 10 мкм. В состав бактериальной клетки входят капсула, клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана и цитоплазма, в которой содержатся нуклеоид, рибосомы и включения (рис. 12). Некоторые бактерии снабжены жгутиками (рис. 13) и ворсинками. Ряд бактерий образуют споры, которые располагаются терминально, субтерминально или центрально (рис. 14); превышая поперечный размер клетки, споры придают ей веретенообразную форму.



Рис. 13. Жгутики бактерий (схема).  
 а – монотрих; б – лофотрих; в – амфитрих;  
 г – перитрих.

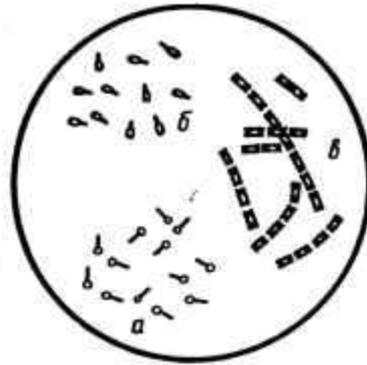
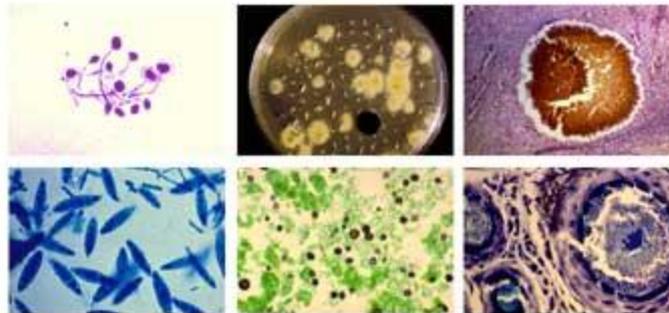


Рис. 14. Споры бактерий (схема).  
 а – терминальное расположение; б – субтерминальное; в – центральное.



# Морфология бактерий

- Для изучения морфологии бактерий из них готовят нативные (прижизненные) препараты и фиксированные мазки, которые окрашивают анилиновым красителем. В основе окраски лежат сложные химические и физико-химические реакции. Протоплазма бактерий, особенно в фиксированных мазках, обладает сродством к основным красителям. Поэтому для их окраски используют главным образом основные красители: метиленовый синий, \* Различают простые и сложные методы окраски (по Граму, Цилю — Нельсену и др.). Последние имеют дифференциально-диагностическое значение. Отношение микроорганизмов к красителям расценивают как тинкториал



# Выделение чистой культуры

## ■ Этапы выделения чистой культуры бактерий

### *I этап (нативный материал)*

Микроскопия (ориентировочное представление о микрофлоре).

Посев на плотные питательные среды (получение колоний).

### *II этап (изолированные колонии)*

Изучение колоний (культуральные свойства бактерий).

Микроскопическое изучение микробов в окрашенном мазке (морфологические свойства бактерий).

Посев на скошенный питательный агар для выделения чистой культуры.

### *III этап (чистая культура)*

Определение культуральных, морфологических, биохимических

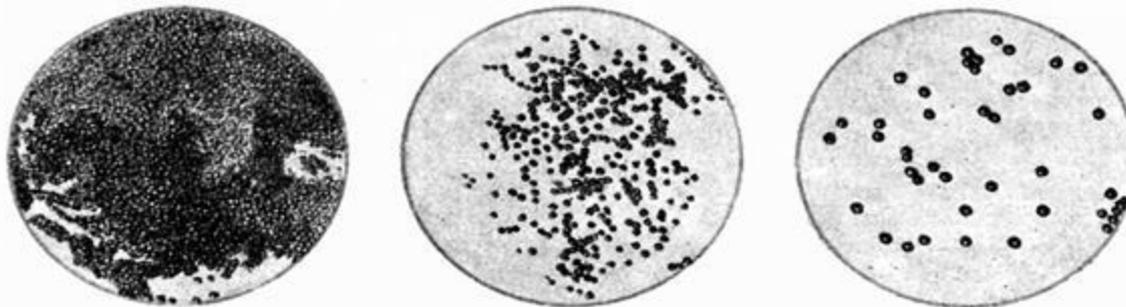
и других свойств для идентификации культуры бактерий



- **Метод последовательных разведений**, предложен Л. Пастером, был одним из самых первых, который применялся для механического разъединения микроорганизмов. Он заключается в проведении последовательных серийных разведений материала, который содержит микробов, в стерильной жидкой питательной среде. Этот прием достаточно кропотлив и несовершенный в работе, поскольку не позволяет контролировать количество микробных клеток, которые попадают в пробирки при разведениях.
- Этого недостатка не имеет **метод Коха (метод пластинчатых разведений)**. Р. Кох использовал плотные питательные среды на основе желатины или агара. Материал с ассоциациями разных видов бактерий разводился в нескольких пробирках с растопленным и кое-что охлажденным желатином, содержание которых позже выливалось на стерильные стеклянные пластины. После застудневания среды оно культивировалось при оптимальной температуре. В его толще образовывались изолированные колонии микроорганизмов, которые легко могут быть перенесены на свежую питательную среду с помощью платиновой петли для получения чистой культуры бактерий.



- **Метод Дригальского** является более совершенным методом, который широко распространен в повседневной микробиологической практике. Сначала на поверхность среды в чашке Петри пипеткой или петлей наносят исследуемый материал. С помощью металлического или стеклянного шпателя его тщательным образом втирают в среду. Чашку во время посева держат привидкрытую и осторожно вращают, чтобы равномерно распределить материал. Не стерилизуя шпателя, проводят им занял материалу в другой чашке Петри, при потребности – в третьей. Только после этого шпатель окунают в дезинфикующий раствор или прожаривают в пламени горелки. На поверхности среды в первой чашке наблюдаем, как правило, сплошной рост бактерий, во второй – густой рост, а в третьей – рост в виде изолированных колоний.



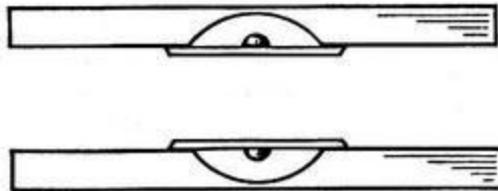
# Приготовление препаратов для микроскопического исследования.

- **Взятие материала для исследования.** Для приготовления препарата исследуемый материал берут из пробирки, колбы или чашки Петри бактериологической петлей или стерильной пипеткой. В некоторых случаях используют для этой цели препаровальные иглы.
- Пробирку с бактериальной культурой берут в левую руку, а петлю за петледержатель — в правую. Петлю прожигают в пламени горелки до покраснения. Вращательным движением вынимают из пробирки ватную пробку, прижимая ее V и IV пальцами правой руки к ладони, и обжигают край пробирки. Осторожно вводят петлю в пробирку, охлаждая ее о внутреннюю поверхность, после чего легким скользящим движением берут материал. Затем вынимают петлю из пробирки, снова обжигают ее край и затыкают пробкой. После приготовления препарата петлю обязательно прожигают (стерилизуют) в пламени. Жидкий материал из пробирки или колбы можно набирать пипеткой, удерживая ее в правой руке и закрыв отверстие II пальцем.

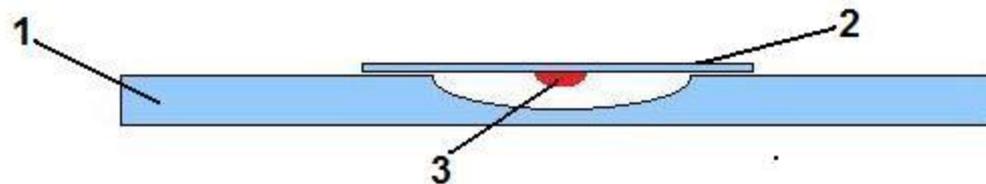


# Приготовление препаратов для изучения микроорганизмов в живом состоянии.

- **Метод «висячей» капли.** Препарат готовят на покровном стекле, в центр которого наносят одну каплю бактериальной культуры. Затем предметное стекло с лункой, края которой предварительно смазывают вазелином, прижимают к покровному стеклу так, чтобы капля находилась в центре лунки. Быстрым движением переворачивают препарат покровным стеклом вверх. В правильно приготовленном препарате капля должна свободно висеть над лункой, не касаясь ее дна или края. Для микроскопии вначале используют малый сухой объектив 8, под увеличением которого находят край капли, а затем устанавливают объектив 40 и исследуют препарат.

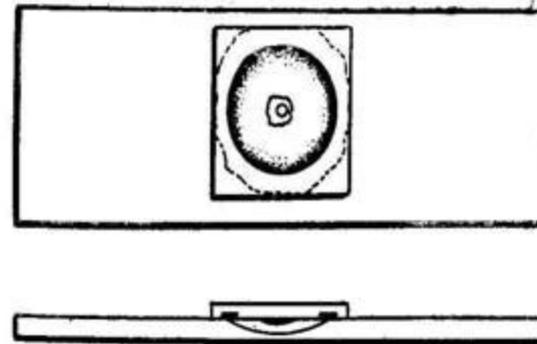


Приготовление висячей капли.



- 1- предметное стекло с углублением в центре,  
2 – покровное стекло,  
3 – капля суспензии микроорганизмов.

- **Метод «раздавленной» капли.** На поверхность обезжиренного предметного стекла наносят каплю исследуемого материала или суспензию бактерий и покрывают ее покровным стеклом. Капля должна быть небольшой, не выходящей за край покровного стекла. Микроскопируют препарат с объективом 40.



## Приготовление фиксированных препаратов-мазков.

- Для приготовления препарата на обезжиренное предметное стекло наносят каплю воды или изотонического раствора хлорида натрия, в которую петлей вносят исследуемый материал и распределяют его таким образом, чтобы получить тонкий и равномерный мазок диаметром около 1—1,5 см, только при таком распределении материала в мазке можно увидеть изолированные бактериальные клетки. Если исследуемый материал содержится в жидкой среде, то петлей его непосредственно наносят на предметное стекло и готовят мазок. Мазки высушивают на воздухе или в струе теплого воздуха над пламенем горелки.
- Для фиксации мазка предметное стекло (мазком вверх) медленно проводят 3 раза (в течение 3 с) через пламя горелки. Микроорганизмы при фиксации погибают, плотно прикрепляясь к поверхности стекла, и не смываются при дальнейшей обработке. Более длительное нагревание может вызвать деформацию клеточных структур. Мазки крови, мазки-отпечатки органов и тканей и в некоторых случаях мазки из культур микроорганизмов фиксируют погружением на 5—20 мин в метиловый или этиловый спирт, смесь Никифорова, сулемовый спирт или другие фиксирующие жидкости."

# Методы окраски мазков

- Простой метод. Фиксированный мазок окрашивают каким-либо одним красителем, например фуксином водным (1—2 мин) или метиленовым синим (3—5 мин), промывают водой, высушивают и микроскопируют.
- Сложные методы. Включают последовательное нанесение на препарат красителей, различающихся по химическому составу и цвету, протрав и дифференцирующих веществ. Это позволяет выявить определенные структуры клеток и дифференцировать одни виды микроорганизмов от других.
- **Окраска по методу Грама.** 1. На фиксированный мазок наносят карболово-спиртовой раствор генцианового фиолетового через полоску фильтровальной бумаги. Через 1—2 мин ее снимают, а краситель сливают..
- 2. Наносят раствор Люголя на 1—2 мин.
- 3. Обесцвечивают препарат этиловым спиртом в течение 30—60 с до прекращения отхождения фиолетовых струек красителя.
- 4. Промывают препарат водой.
- 5. Докрашивают мазок водным раствором фуксина в течение 1—2 мин, промывают водой, высушивают и микроскопируют.
- Грамположительные бактерии окрашиваются в темно-фиолетовый цвет, грамотрицательные — в красный (рис. 16).

# Техника микроскопирования

1. Микроскопирование гистологического препарата начинают с установки правильного *освещения*. Для этого с помощью [вогнутого зеркала](#), собирающего рассеянный пучок света, и [конденсора](#) достигают равномерного освещения поля зрения.
2. На предметный столик помещают гистологический препарат покровным стеклом вверх.
3. Изучение гистологического препарата начинают при [малом увеличении](#) (объектив x8), при этом расстояние между объективом и покровным стеклом должно быть около 1 см. *Установку резкости* проводят с помощью [макрвинта](#).
4. Рассматривают детали гистологического препарата по всей площади, перемещая его на предметном столике.
5. Устанавливают в центр поля зрения участок гистологического препарата, который следует изучить при [большом увеличении](#) (объектив x40).
6. С помощью [револьверного устройства](#) ставят объектив с более сильным увеличением (x40). *Установку резкости* проводят с помощью [микровинта](#).
7. Для изучения очень мелких гистологических структур используют [иммерсионный объектив](#) (x90).
  - На покровное стекло препарата наносят каплю иммерсионного масла.
  - Осторожно опускают тубус до соприкосновения линзы объектива к маслу.
  - *Установку резкости* проводят с помощью [микровинта](#).
  - После окончания работы иммерсионное масло удаляют с объектива и покровного стекла марлей.

## Отношение бактерий к окраске по Граму

- Отношение бактерий к окраске по Граму определяется их способностью удерживать образовавшийся в процессе окраски комплекс генцианового фиолетового с йодом. Это зависит от различий в химическом составе и в проницаемости клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также от **соотношения РНК и ДНК** в их цитоплазме. В клеточной стенке грамположительных бактерий наиболее выражен муреиновый (мукопептидный слой), содержащий гликопептиды и тейхоевую кислоту. Пептидогликаны грамположительных бактерий структурно отличаются от грамотрицательных бактерий. Тейхоевые кислоты стабилизируют ионы магния на поверхности клеток. У грамположительных бактерий на поверхности клетки имеется комплекс протеин — рибонуклеат магния; соотношение РНК и ДНК в их цитоплазме составляет **8 : 1**; у грамотрицательных бактерий это соотношение равно **1 : 1**. Изoeлектрическая точка цитоплазмы у грамположительных бактерий находится при pH 2,0—3,0, у грамотрицательных — около 5,0. После обработки раствором йода, являющегося окислителем, происходит **сдвиг изoeлектрической точки** в кислую сторону, выраженный у грамположительных бактерий в большей степени, чем у грамотрицательных.
- Кроме того, **проницаемость клеточной стенки** у грамположительных бактерий меньше, чем у грамотрицательных. Таким образом, у грамположительных бактерий создаются оптимальные условия для прочной фиксации красителя и резистентности к обесцвечиванию спиртом. Окраска по Граму имеет важное дифференциально-диагностическое значение и широко используется в микробиологии. К грамположительным бактериям относятся стафилококки, стрептококки, коринебактерии дифтерии, микобактерии туберкулеза и др., к грамотрицательным — гонококки, менингококки, кишечная палочка и др. Некоторые виды бактерий могут окрашиваться по Граму вариabельно в зависимости от возраста, особенностей культивирования и других факторов, изменяющих структуру клеточной стенки.
- Основная **ошибка**, допускаемая при окраске по Граму,
- состоит в **переобесцвечивании или недообесцвечивании мазка спиртом**. В первом случае грамположительные бактерии могут утрачивать первоначальную окраску генциановым фиолетовым и приобретать красный цвет (характерный для грамотрицательных бактерий) в результате последующей докраски мазка фуксином. Во втором случае грамотрицательные бактерии могут сохранять сине-фиолетовый цвет генцианового фиолетового. Для правильной окраски следует строго соблюдать технику обесцвечивания

## Окраска кислотоустойчивых бактерий по методу Циля— Нельсена.

1. На фиксированный мазок наносят карболовый раствор фуксина через полоску фильтровальной бумаги и подогревают до появления паров в течение 3—5 мин.

- 2. Снимают бумагу, промывают мазок водой.
  - 3. На мазок наносят 5% раствор серной кислоты или 3% раствор солянокислого спирта на 1—2 мин для обесцвечивания.
  - 4. Промывают водой.
  - 5. Докрашивают мазок водным раствором метиленового синего в течение 3—5 мин.
  - 6. Промывают водой, высушивают и микроскопируют.
- Кислотоустойчивость обусловлена наличием в клеточной стенке и цитоплазме бактерий повышенного количества ли-пидов, воска и оксикислот, в частности миколовой кислоты. Раствор карболовой кислоты разрыхляет клеточную стенку и тем самым повышает ее тинкториальные свойства, а высокая концентрация красителя и нагревание в процессе окраски усиливают реакцию взаимодействия красителя с бактериальными клетками, которые окрашиваются при этом в красный цвет. При обработке препарата серной кислотой некислотоустойчивые бактерии обесцвечиваются и окрашиваются метиленовым синим в голубой цвет, а кислотоустойчивые бактерии остаются окрашенными фуксином в красный цвет

- **Окраска спор по методу Ожешки.** 1. На нефиксированный мазок наносят 0,5% раствор хлористоводородной кислоты и подогревают на пламени горелки в течение 2—3 мин.  
2. Кислоту сливают, препарат промывают водой, просушивают и фиксируют над пламенем горелки.  
3. Окрашивают препарат по Цилю — Нельсену. Споры бактерий при этом приобретают красный цвет, а вегетативные формы — синий (рис. 18).
- **Окраска зерен волютина по методу Нейссера.** 1. На фиксированный мазок наносят ацетат синьки Нейссера на 2—3 мин. 2. Наносят раствор Люголя на 10—30 с.  
3. Промывают препарат водой.  
4. Мазок докрашивают водным раствором везувина или хризоидина в течение 54—1 мин.  
5. Промывают водой, высушивают и микроскопируют. Зерна волютина представляют собой соединения, имеющие  
в отличие от цитоплазмы щелочную реакцию и поэтому избирательно воспринимают ацетат синьки, окрашиваясь в темно-синий цвет. Цитоплазма клетки, обладающая кислой реакцией, воспринимает щелочной краситель везувин и окрашивается в желтый цвет (рис. 19).

# Схема выделения чистой культуры спорообразующих анаэробных микроорганизмов



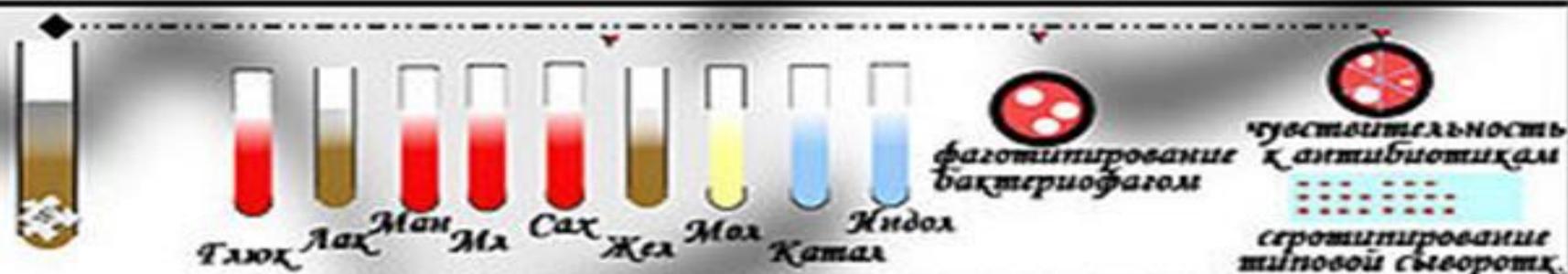
## 1. Накопление инфекционного материала



## 2. Учет роста на среде Китт-Тароцци. Выделение изолированных колоний Пересев смешанной культуры в трубки Вейон-Виньяля.



## 3. Накопление чистой культуры



## 4. Идентификация видового состава (серо- и фаготипов)

- **Обнаружение капсул по методу Бурри—Гинса.** 1. Готовят препарат по Бурри: смешивают каплю взвеси микробов с каплей туши и при помощи стекла со шлифовальным краем готовят мазок так же, как мазки из крови; затем его высушивают и фиксируют.
- 2. На мазок наносят водный раствор фуксина на 1—2 мин.
- 3. Промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют. При этом бактерии окрашиваются в красный цвет, а неокрашенные капсулы контрастно выделяются на черно-розовом фоне (рис. 20).
- **Измерение микробов**
- Все микроскопические объекты измеряются в нанометрах (нм) и микрометрах (мкм): 1 мкм—1000 нм; 1 нм—10<sup>-8</sup> мкм; 1 мкм—1000 нм. Для измерения микробов применяются окуляр-микрометр и объект-микрометр. Окуляр-микрометр служит для непосредственного измерения объекта и представляет собой стеклянную пластинку, в центральной части которой нанесена шкала с 50 делениями. Объект-микрометр представляет собой стекло, в середине которого имеется эталонная шкала, разделенная на 100 частей. Цена деления шкалы известна и указана на стекле. Обычно каждое деление шкалы объект-микрометра равно 10 мкм.

## Определение протеолитических свойств микробов.

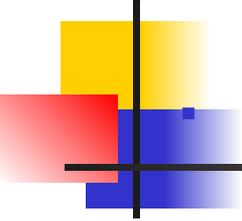
*Методика определения аммиака.* Аммиак в среде с бактериальной культурой определяют при помощи реактива Несслера. Для этого в фарфоровую чашку пипеткой вносят каплю культуры, выращенной на мясо-пептонном бульоне, и каплю реактива Несслера.

При наличии аммиака смесь окрашивается в желтый или коричневый цвет. Коричневое окрашивание указывает на большое содержание продукта гнилостного распада.

^ *Методика определения сероводорода.* Над культурой исследуемых микробов помещают полоску фильтровальной бумаги, смоченную раствором уксуснокислого свинца (бумага закрепляется между пробкой и стенкой пробирки). Пробирки помещают до трех суток в термостат. Почернение бумаги происходит при содержании сероводорода, который превращает уксуснокислый свинец в сернокислый.

^ *Методика определения индола.* Определение по методу Морелли осуществляют с помощью полоски фильтровальной бумаги, обработанной горячим насыщенным 12 %-ным водным раствором щавелевой кислоты и высушенной в термостате. Бумагу закрепляют между пробкой и стенкой пробирки. Пробирки с исследуемой культурой помещают в термостат на трое суток. Порозовение нижней части индикаторной бумаги указывает на наличие индола.

# Сахаролитические свойства микробов



**Сахаролитические свойства микробов** определяют путем посева чистой культуры на специальные среды, содержащие различные углеводы (лактозу, сахарозу, глюкозу, мальтозу, маннит и др.) и индикатор (нейтральный красный, лакмус, фуксин основной и др.).

Наиболее распространенной является среда Гисса, которая представляет собой смесь сахара и индикатора в пептонной воде. Помещают в термостат при температуре 25 – 30 оС (для патогенных – 37 оС). Для улавливания газа на дно пробирки со средой опускают «газовки» – поплавки для улавливания газа. Образовавшийся в процессе ферментации газ вытесняет часть среды и скапливается вверху «газовки». При этом разложение микроорганизмами того или иного углевода сопровождается цветной реакцией благодаря присутствию индикатора.

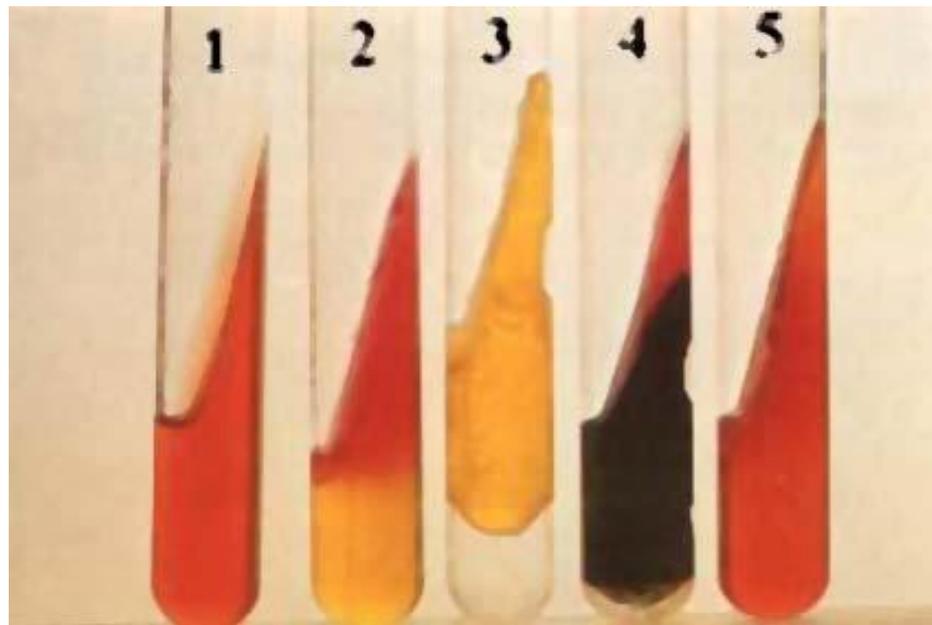
Определяют в каждой пробирке происшедшие изменения, указывают наличие кислотообразования буквой «К», что видно по покраснению среды, и газообразования буквой «Г», в том случае, если поплавок заполнен газом.

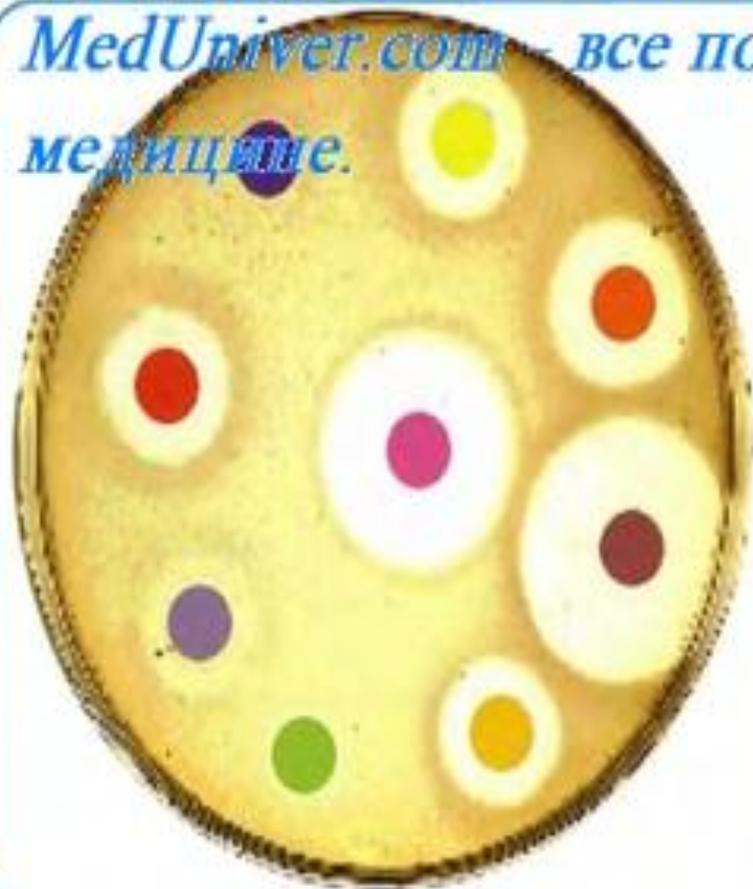
В зависимости от вида микроорганизмов сбраживание углеводов происходит с образованием различных продуктов, в основе которых лежат различные виды брожений (спиртовое, уксуснокислое, молочнокислое и др.).

- Культуру микроорганизмов высевают на жидкие среды Гисса. Приготавливают препарат-мазок, окрашивают по Граму. Микроскопируют и определяют морфологию микроба. Зарисовывают микроскопическую картину.

## Рост микроорганизмов на среде Олькеницкого.

- 1 - незасаженная среда;
- 2 - микроорганизмы разлагают глюкозу до кислоты;
- 3 - микроорганизмы разлагают глюкозу и лактозу до кислоты и газа;
- 4 - микроорганизмы образуют сероводород;
- 5 - рост микроорганизмов, которые не разлагают сахара.





### *Определение чувствительности к антибиотикам диско-диффузионным методом*

Диск с антибиотиком наносится на поверхность питательной среды после посева культуры бактерий. В результате диффузии антибиотика из диска рост чувствительного возбудителя подавляется (зона задержки роста). Метод стандартизован только для «быстрорастущих» микроорганизмов, образующих сплошной рост на плотной питательной среде (в виде «газона») через 18–20 часов инкубации. Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) природно устойчива ко многим антибиотикам. Для лечения инфекций, вызванных *P. aeruginosa*, применяют бета-лактамы, аминогликозиды и хинолоны.

Рис. 3.15. Определение чувствительности синегнойной палочки к антибиотикам