Структура бактериальной клетки. Особенности строения спирохет, риккетсий, микоплазм, актиномицетов, хламидий. Бактериоскопический метод. Простые и сложные методы окраски. Окраска по Граму. Методы выявления капсул, жгутиков и спор. Изучение микробов в живом состоянии. Методы микроскопирования.

Структура бактериальной клетки

Структура бактериальной клетки

Основные структуры

клеточная стенка,

цитоплазматическая мембрана,

цитоплазма с включениями,

нуклеоид.

Дополнительные структуры

капсула,

жгутики,

пили,

плазмиды.

Бактериальную клетку окружает **оболочка**, состоящая из клеточной стенки и цитоплазматической мембраны.

Под оболочкой находится цитоплазма, состоящая из цитозоля и содержащая нуклеоид, рибосомы и включения.

Основные структуры присущи всем бактериальным клеткам.

Некоторые бактерии в неблагоприятных условиях способны образовывать споры (эндоспоры).

Дополнительные структуры имеются не у всех бактерий.

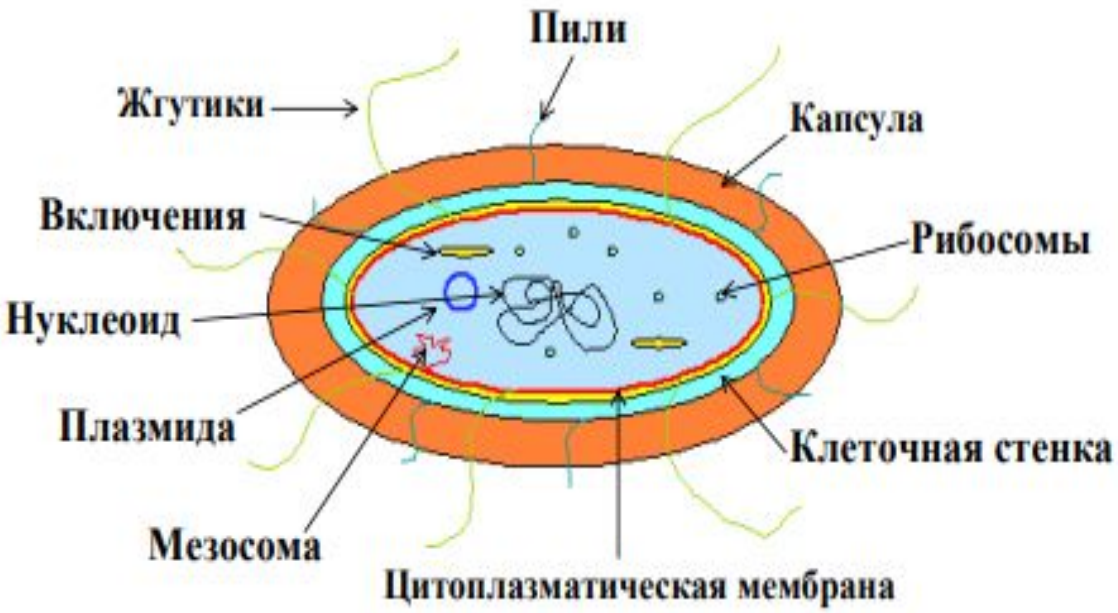
Бактериальная оболочка

Состоит из клеточной стенки и располагающейся под ней цитоплазматической мембраны.

Клеточная стенка - это ригидная структура, которая придает бактериальной клетке определенную форму.

Она защищает внутреннее содержимое клетки от вредных воздействий внешней среды, участвует в процессах деления клетки и транспорта метаболитов.

На поверхности клеточной стенки располагаются рецепторы для бактериофагов, бактериоцинов, антибиотиков и других химических веществ.



По строению клеточной стенки различают

фирмикутные бактерии, Firmicutes (грамположительные, толстостенные),

грациликутные бактерии, Gracilicutes (грамотрицательные, тонкостенные),

бактерии, не имеющие клеточной стенки **(микоплазмы).**

Подразделение бактерий на грамположительные и грамотрицательные основано на разном восприятии красителей при окраске по методу, предложенному датским бактериологом **Г. К. Грамом.**

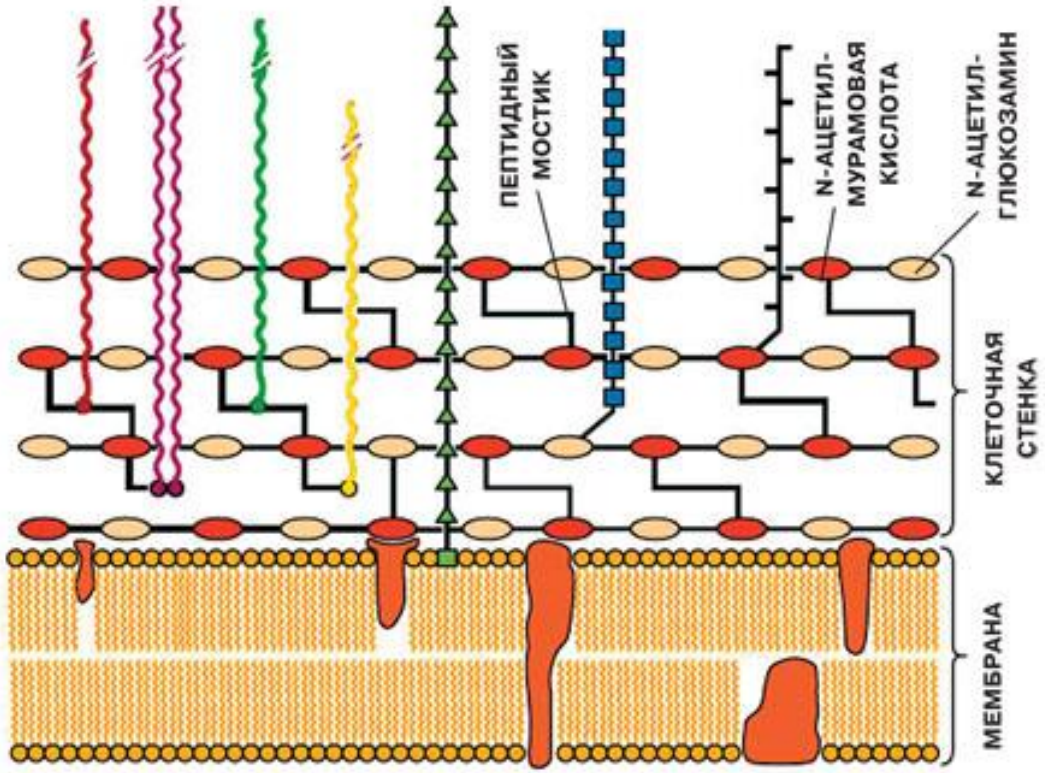
Ганс Кристиан Грам (1853-1938)

Клеточная стенка грамположительных бактерий

Гомогенный слой толщиной 20-80 нм.

Состоит из многослойного пептидогликана (муреина), пронизанного молекулами тейхоевой и липотейхоевой кислот.

Пептидогликан клеточной стенки образован параллельно расположенными молекулами гликана, состоящего из остатков **N-ацетилглюкозамина** и **N-ацетилмурамовой кислоты**, соединенных вдоль гликозидной связью. В поперечном направлении молекулы гликана соединены пептидной связью, состоящей из четырех аминокислот



Клеточная стенка грамположительных бактерий

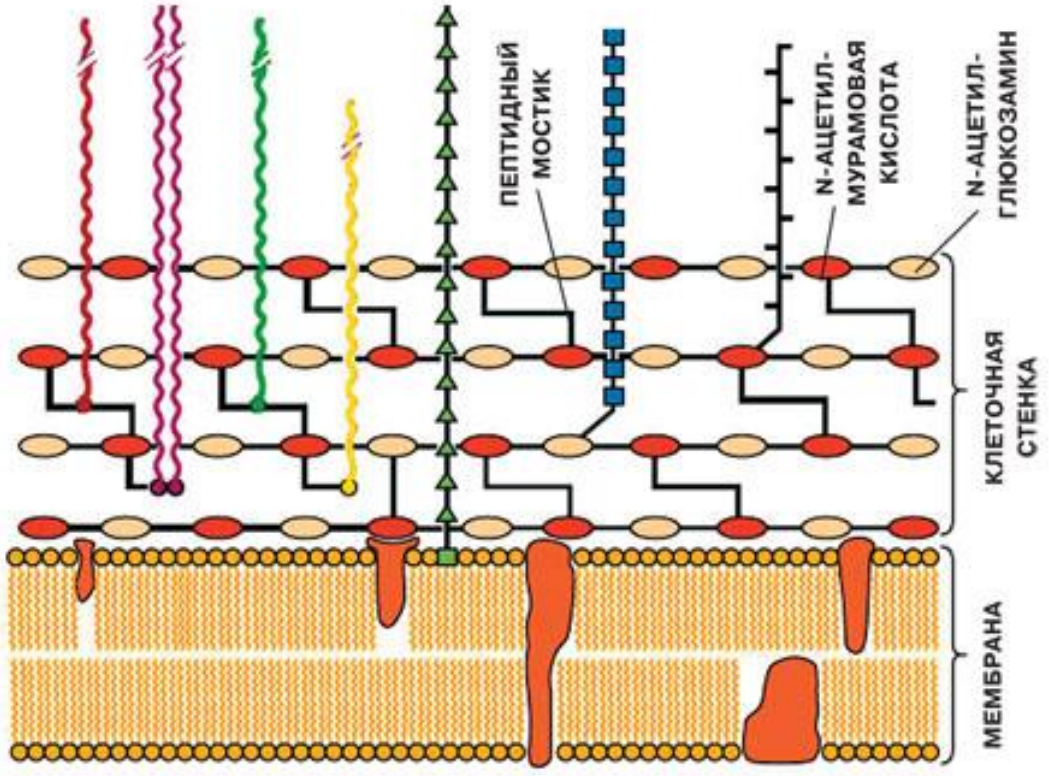
Тейхоевые кислоты представляют собой цепи из остатков глицерола и рибитола, соединенных фосфатными мостиками.

Пептидогликан и тейхоевые кислоты формируют муреиновый мешок, покрывающий клетку снаружи. Тейхоевые кислоты позволяют муреиновому мешку растягиваться и сжиматься, действуя наподобие пружин. Тейхоевые кислоты выполняют антигенную и адгезивную функции грамположительных бактерий.

Пептидогликан плотно прилегает к цитоплазматичекой мембране.

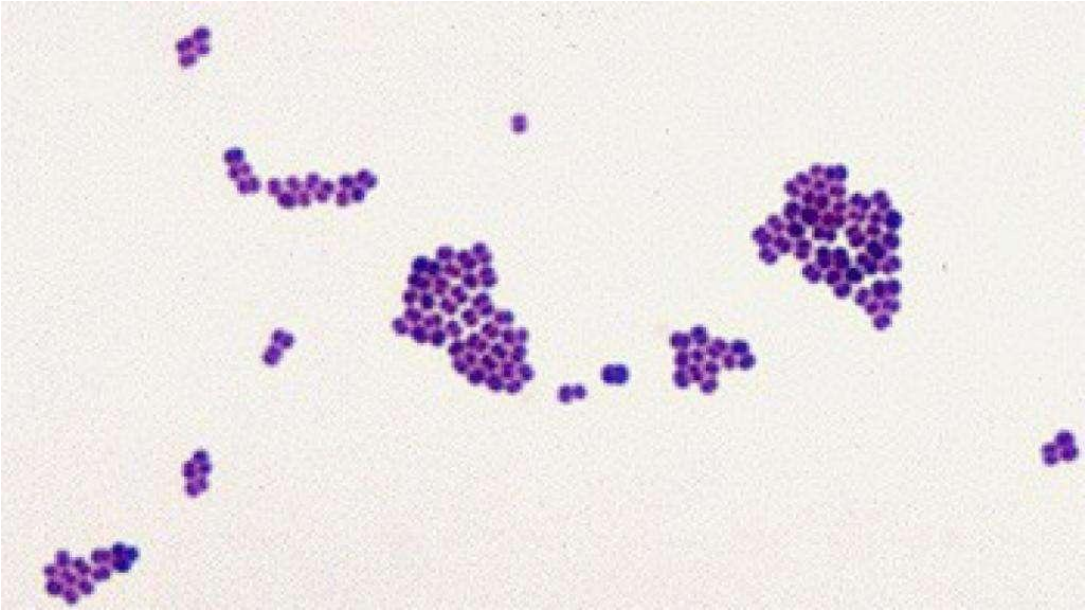
Клеточная стенка содержит также небольшое количество полисахаридов, белков и липидов.

В клеточной стенке имеются поры диаметром 1-6 нм, через которые внутрь клетки проникают различные вещества.



Клеточная стенка грамположительных бактерий

При окраске по Граму толстый слой пептидогликана Гр+ бактерий удерживает генциановый фиолетовый в комплексе с йодом. Последующая обработка препарата спиртом вызывает суживание пор в пептидогликане и тем самым усиливает задержку фиолетового красителя в клеточной стенке. Заключительная окраска препарата фуксином не изменяет первоначальной окраски клеток. Грамположительные бактерии окрашиваются в **сине-фиолетовый цвет.**



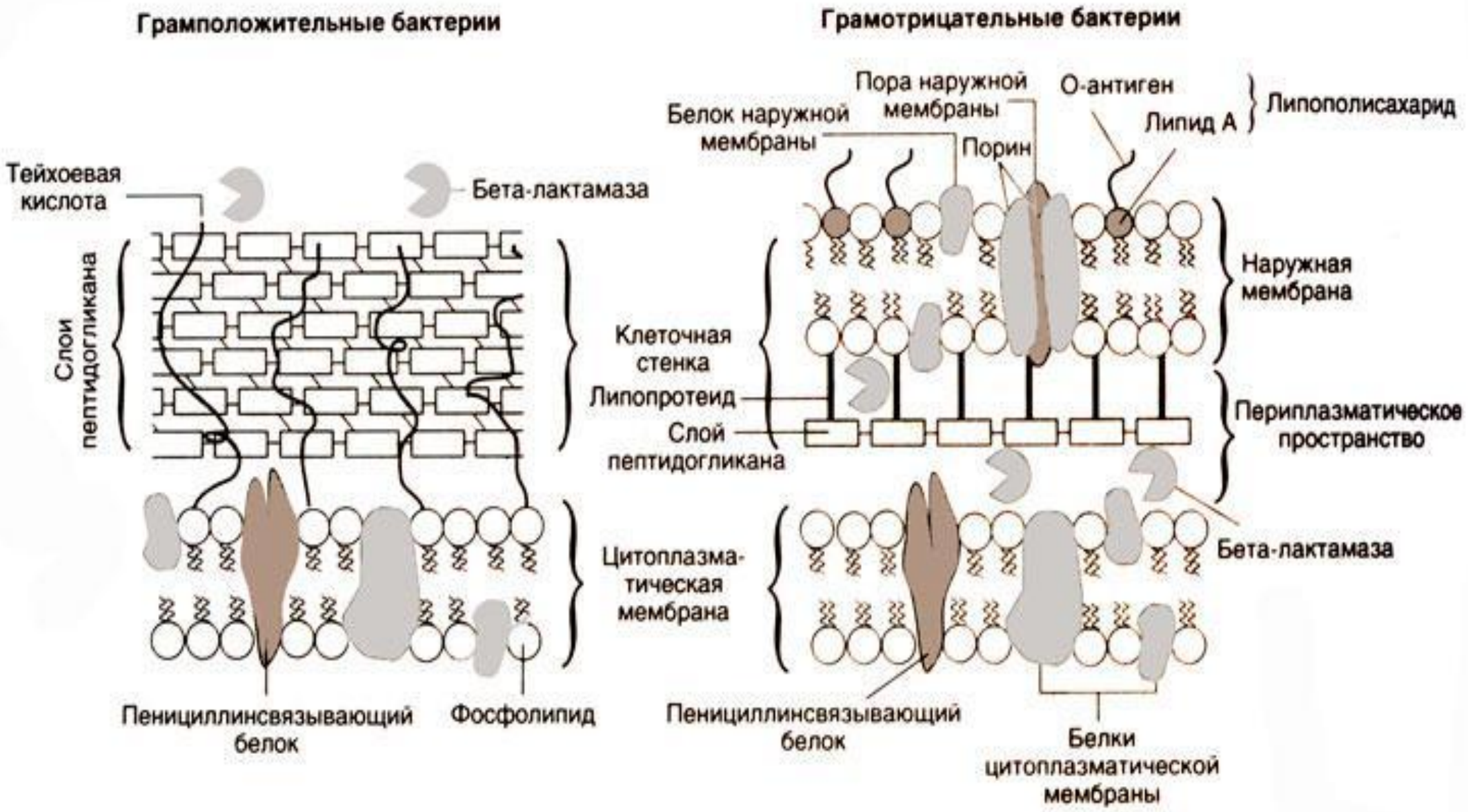


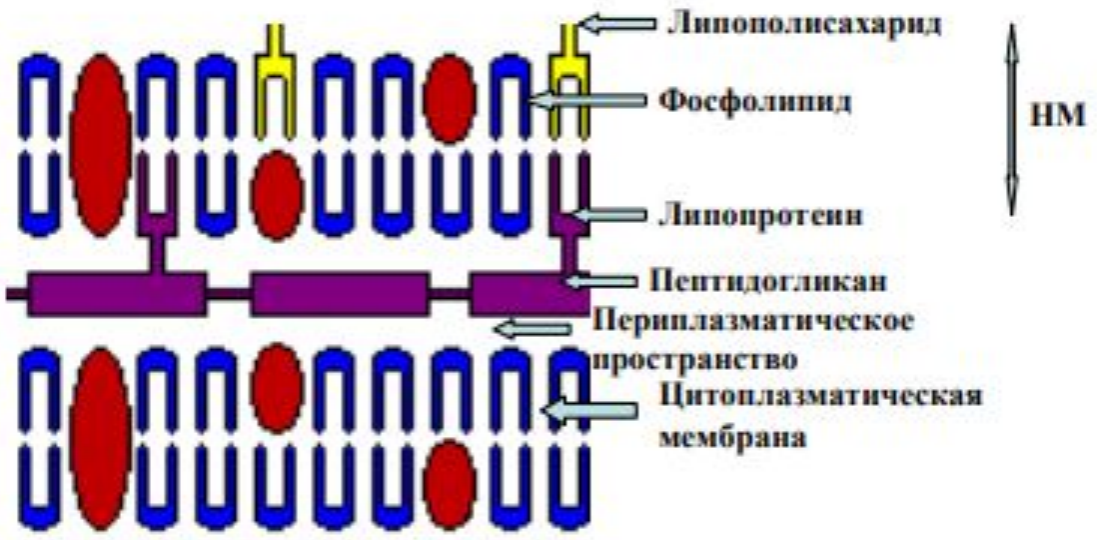
Рисунок 45.3. Клеточная стенка бактерий Tortora et al., 1989.

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий

Толщина 14-18 нм.

Выделяют внешнюю мембрану и тонкий пептидогликановый слой или муреиновый мешок.

Внешняя мембрана представляет собой фосфолипидный бислой, содержащий белки и липополисахарид.



Клеточная стенка грамотрицательных бактерий

Липополисахарид состоит из трех составных частей:

- **липид А** - специфический гликолипид, встроенной в фосфолипидный бислой, закрепляющий молекулу ЛПС во внешней мембране и придающий липополисахариду токсические свойства;
- **ядро** - центральная (стержневая, коровая) область полисахаридной природы;
- **боковая О-цепь**, образованная повторяющимися олигосахаридами (О-антиген).

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий

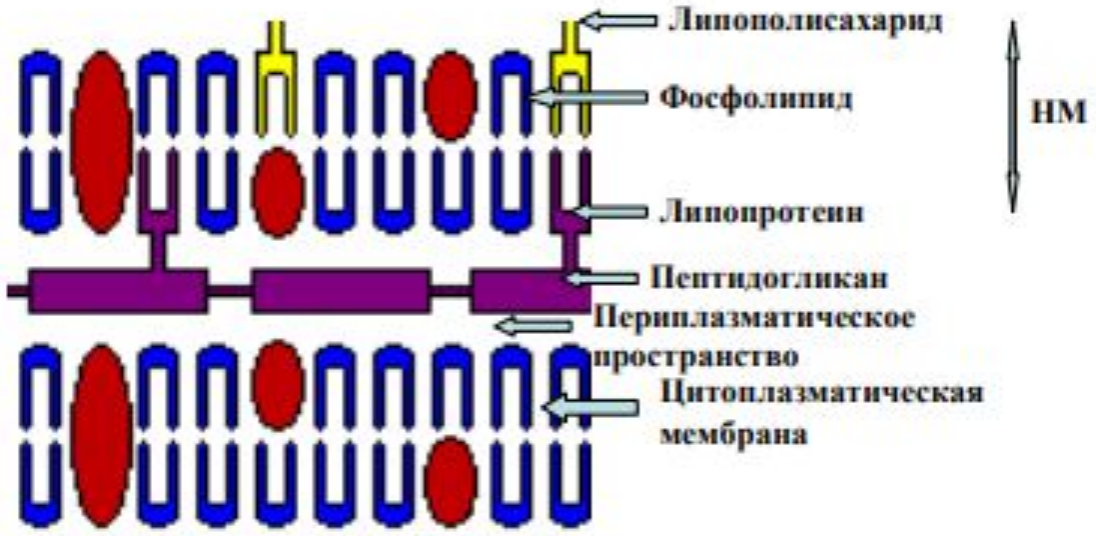
С помощью мембранного **липопротеина** внешняя мембрана связана с подлежащим слоем пептидогликана.

Пептидогликан Гр- бактерий является однослойным (толщина – 2-3 нм) и не содержит тейхоевых кислот.

Под слоем пептидогликана располагается ЦМ.

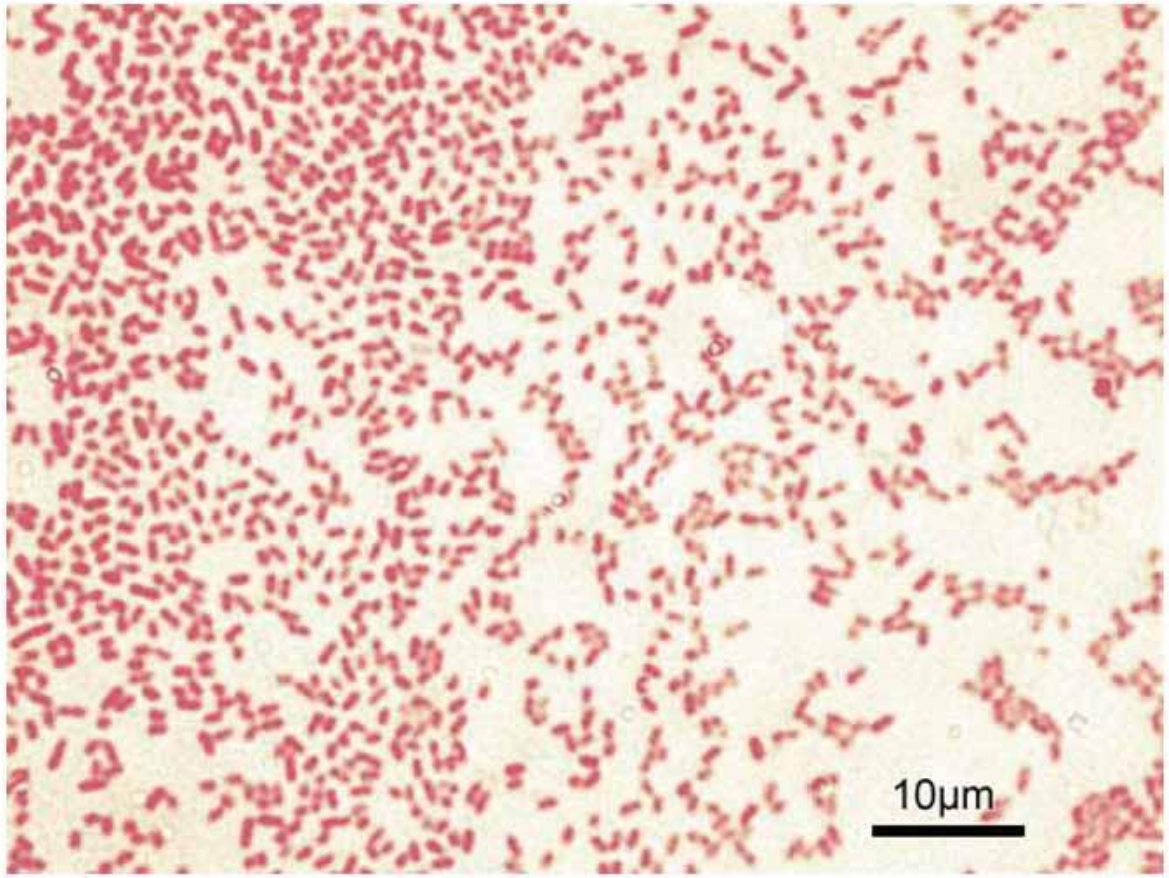
Между НМ, слоем пептидогликана и ЦМ имеется полость, называемая **периплазматическим пространством** (периплазмой) толщиной не более 10 нм. Это пространство заполнено гелем, содержащим транспортные белки и ферменты. В периплазматическом геле располагается муреиновый мешок.

Белки наружной мембраны включают порины, трансмембранные белки и белки, участвующие в формировании поверхностных структур (пилей, жгутиков). Порины образуют каналы для проникновения воды и мелких молекул. Трансмембранные белки обеспечивают связь с муреиновым мешком.

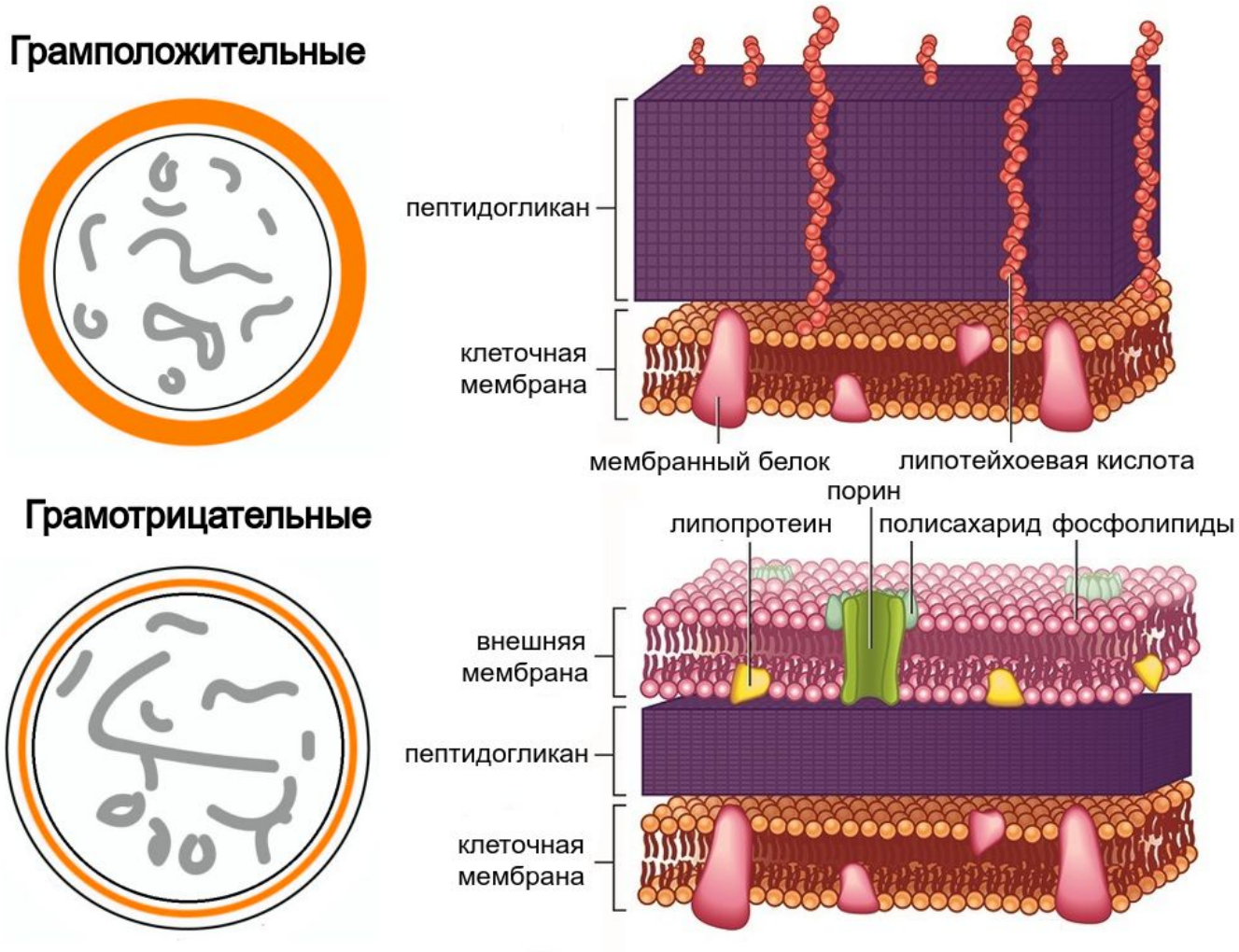


Клеточная стенка грамотрицательных бактерий

При окраске по Граму тонкий слой пептидогликана грамотрицательных бактерий под воздействием этилового спирта утрачивает комплекс генцианового фиолетового и йода. При последующей обработке фуксином или сафранином клетки приобретают **красный цвет.**



Содержание муреина (пептидогликана) у грамположительных бактерий составляет 50-90% сухого вещества клеточной стенки, а у грамотрицательных бактерий – 1-12%.



Клеточная стенка микобактерий

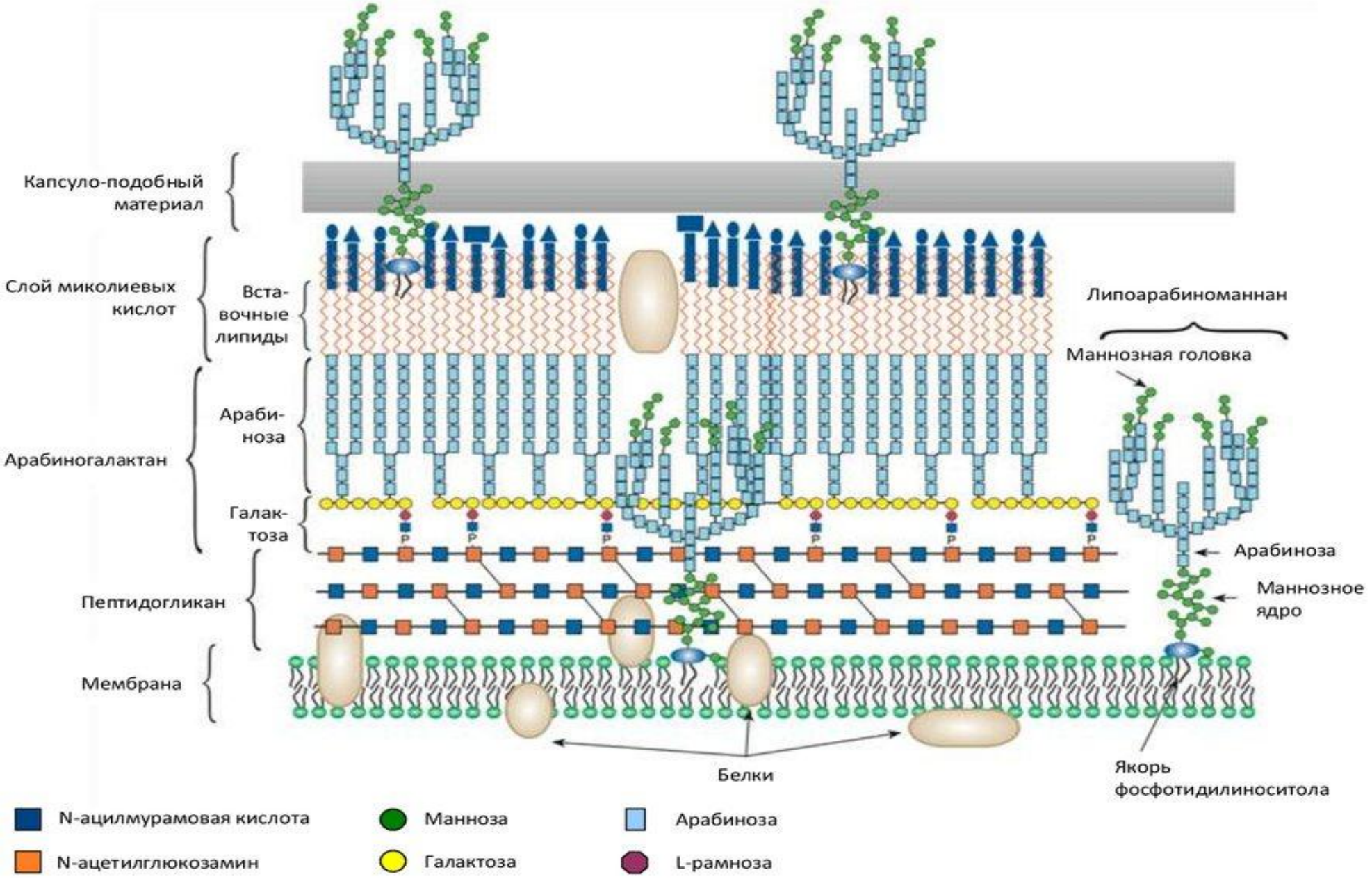
Клеточная стенка состоит из липополисахаридно-мукопептидного комплекса, фибриллы которого содержат миколовую кислоту.

Пептидогликан микобактерии представляет собой двухмерную сеть, которая обеспечивает жесткость клеточной стенки.

С пептидогликаном ковалентно связан полисахарид **арабиногалактан**, к которому в свою очередь присоединяются молекулы **миколовых кислот**.

В результате в клеточной стенке образуется своеобразный каркас - химический комплекс миколовая кислота-арабиногалактан-пептидогликан, составляющий основу клеточной оболочки микобактерии.

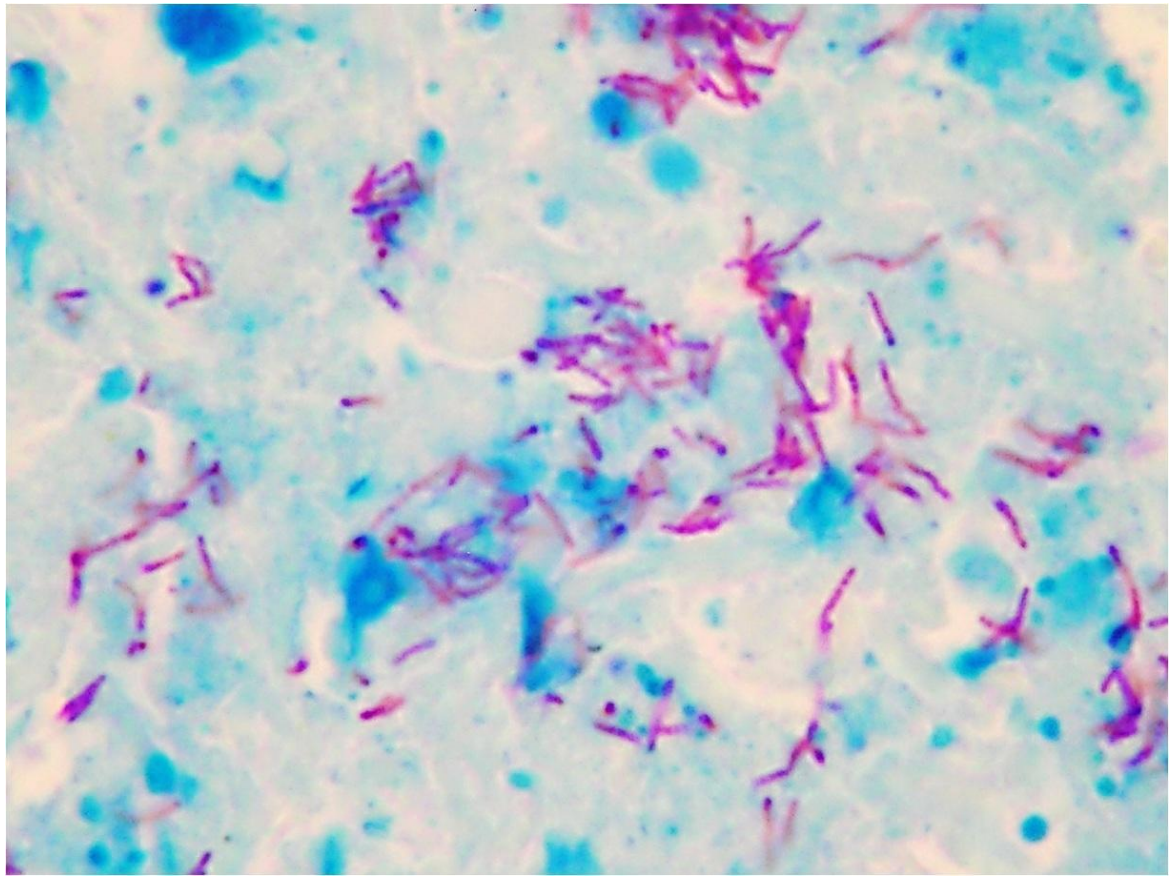
Клеточная стенка микобактерий



Клеточная стенка микобактерий

Кислотоустойчивые бактерии с трудом воспринимают красители в результате наличия в клеточной стенке специфических компонентов (липиды, воска). Основным методом окрашивания кислотоустойчивых бактерий является метод **Циля-Нельсена.**

Кислотоустойчивые бактерии по методу Циля-Нельсена окрашиваются в рубиново-красный цвет, некислотоустойчивые бактерии - в синий цвет.



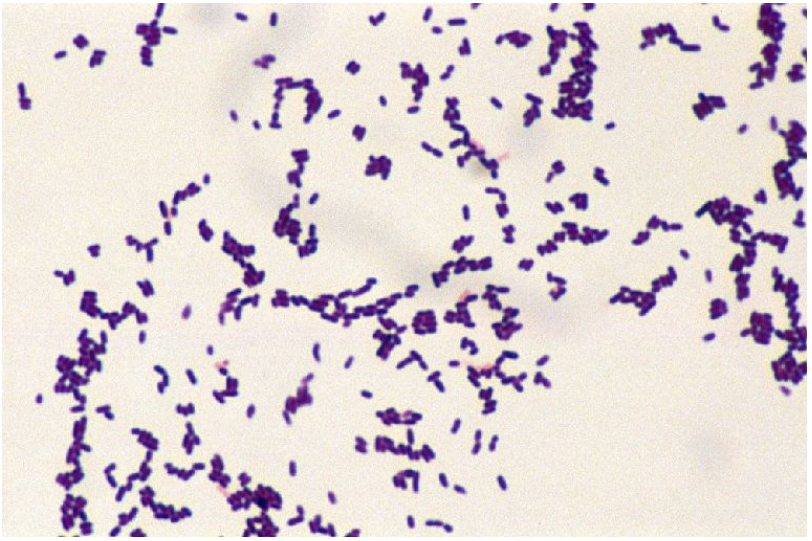
Mycobacterium tuberculosis

Грамположительные бактерии:

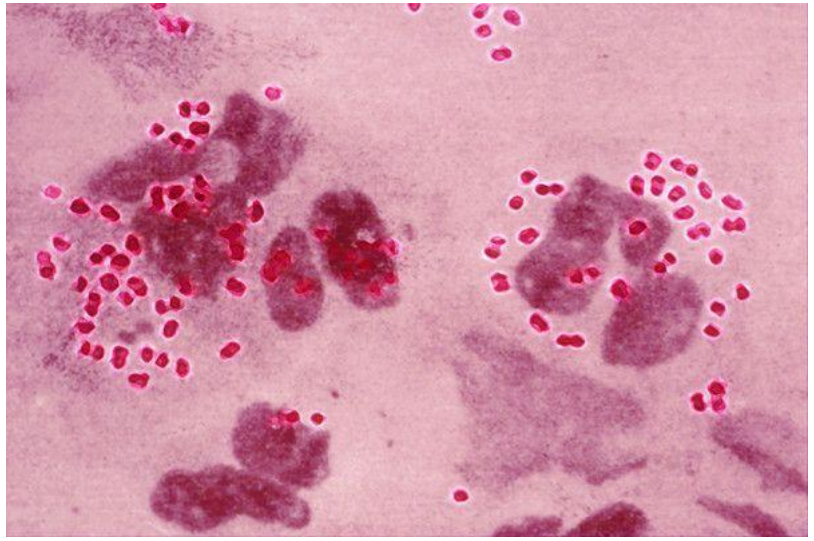
1. Кокки (за исключением р. Neisseria, р. Veillonella);
2. Спорообразующие палочки (р. Bacillus, р. Clostridium);
3. р. Corynebacterium, р. Mycobacterium, р. Listeria.

Грамотрицательные бактерии:

1. Кокки р. Neisseria (гонококки и менингококки), р. Veillonella;
2. Палочковидные бактерии не образующие спор;
3. Извитые формы (вибрионы, спириллы, спирохеты).

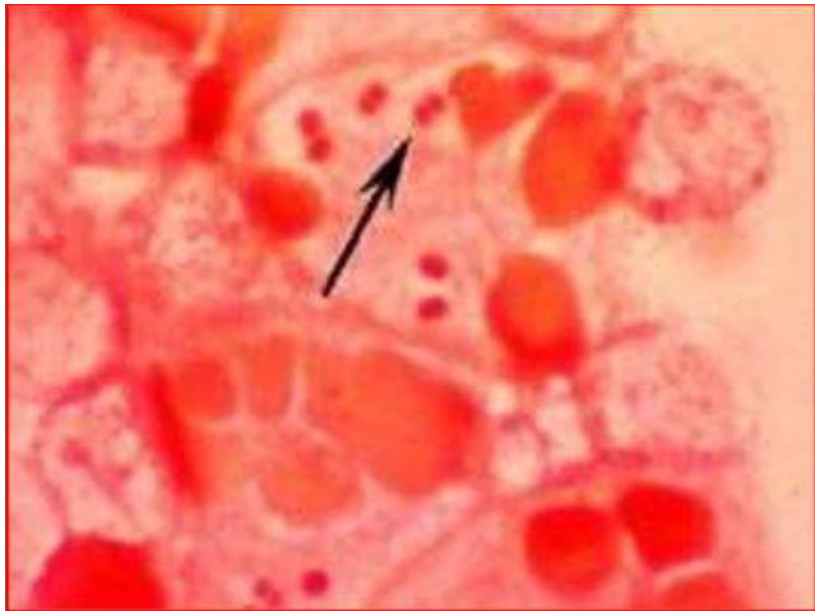


Listeria monocytogenes



Neisseria gonorrhoeae

Clostridium botulinum



Neisseria meningitidis

Клеточная стенка бактерий выполняет следующие функции:

- предохраняет клетку от вредных воздействий окружающей среды;
- обеспечивает постоянство формы клетки;
- сообщает бактериальной клетке антигенные свойства;
- регулирует рост и деление клетки;
- участвует в поступлении внутрь клетки некоторых молекул;
- обеспечивает тинкториальные свойства бактерий (отношение к красителям).

Окраска по Граму

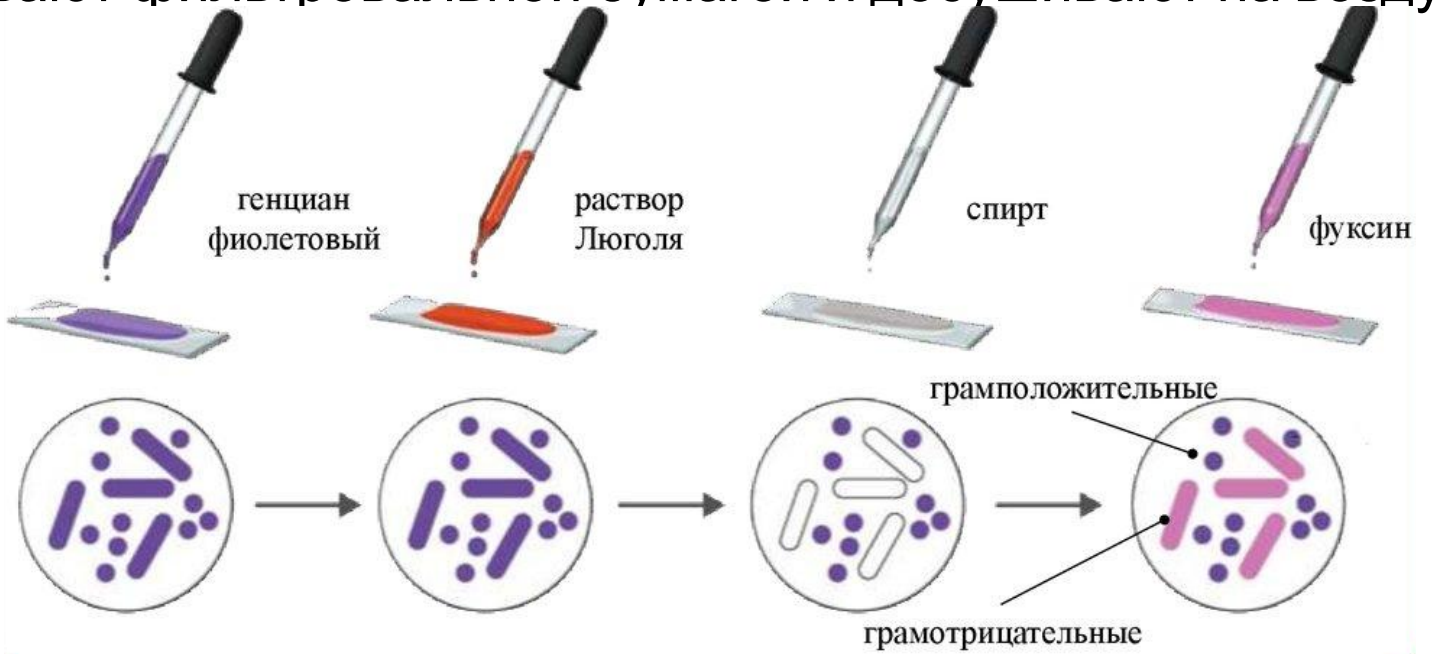
1. На фиксированный препарат наносят несколько капель раствора генцианового фиолетового или помещают полоску фильтровальной бумаги, на которую наливают раствор красителя. Краситель выдерживают в течение 1-2 мин, после чего избыток красителя сливают.

2. Не промывая препарат, наносят несколько капель раствора Люголя и выдерживают в течение 1-2 мин до почернения препарата.

3. На препарат наносят несколько капель этилового спирта (96%) и выдерживают в течение 30 сек. Затем спирт сливают, препарат промывают водой, избыток воды сливают.

4. На препарат наносят несколько капель раствора фуксина и выдерживают в течение 1-2 минут. Избыток красителя смывают водой.

5. Препарат высушивают фильтровальной бумагой и досушивают на воздухе.



Лизоцим,

Пенициллин,

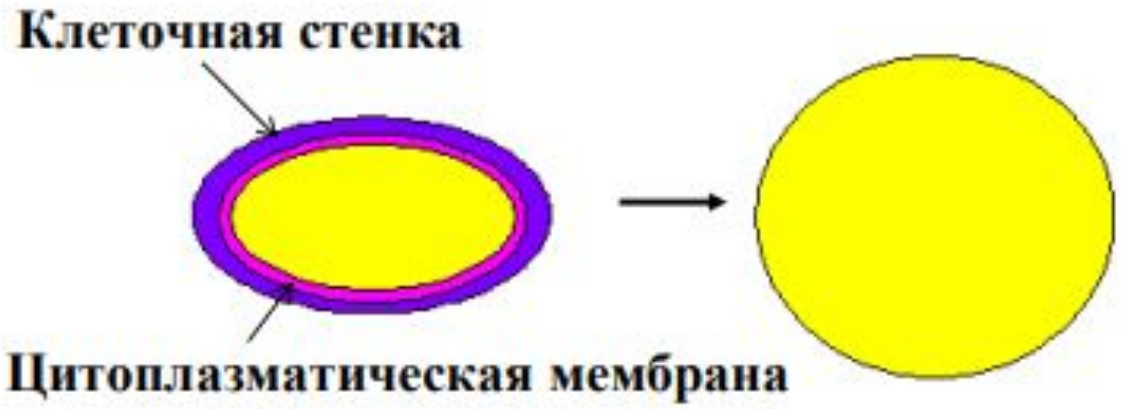
Гуморальные факторы организма

Нарушение синтеза компонентов клеточной стенки

Бактерии полностью или частично лишаются клеточной стенки, образуя шаровидные формы. Такие формы имеют размеры, превышающие исходные клетки в несколько раз.

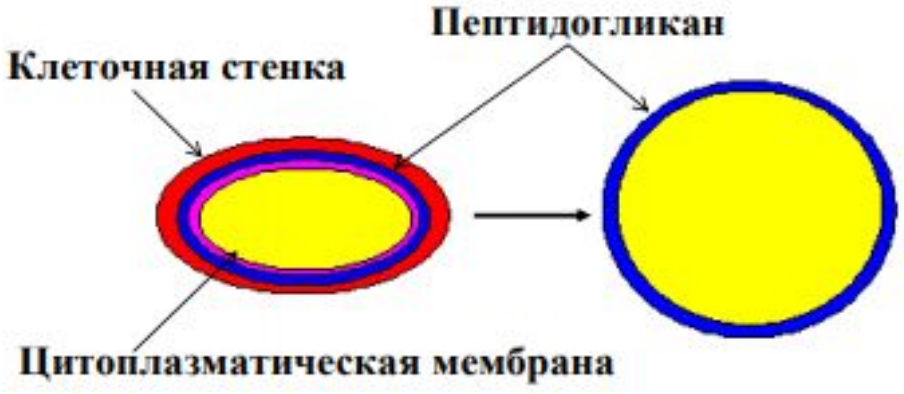
Бактерии, полностью лишенные клеточной стенки - **протопласты**, бактерии, частично сохранившие клеточную стенку - **сферопласты**

Образование протопластов характерно для грамположительных бактерий. Протопластообразование сопровождается утратой толстой пептидогликановой клеточной стенки. Протопласты содержат только цитоплазматическую мембрану. Для их поддержания требуется изотоническая среда. Они устойчивы к антибиотикам и



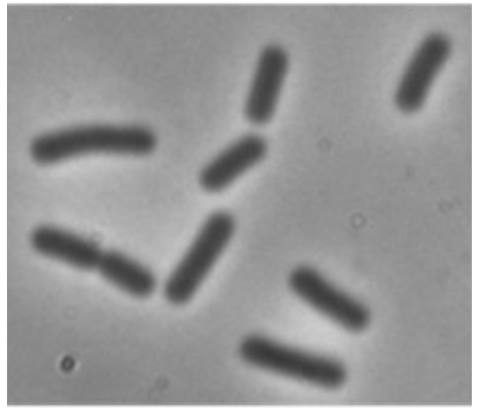
Сферопласты образуются грамотрицательными бактериями. Сопровождается утратой внешней мембраны клеточной стенки. Но сферопласты наряду с цитоплазматической мембраной содержат тонкий слой пептидогликана.

Для поддержания сферопластов также требуется среда с повышенным осмотическим давлением. Сферопласты способны взаимодействовать с бактериофагами, так как содержат остатки пептидогликанового слоя. После удаления ингибиторов, вызвавших нарушение синтеза клеточной стенки, измененные бактерии реверсируют в исходное состояние

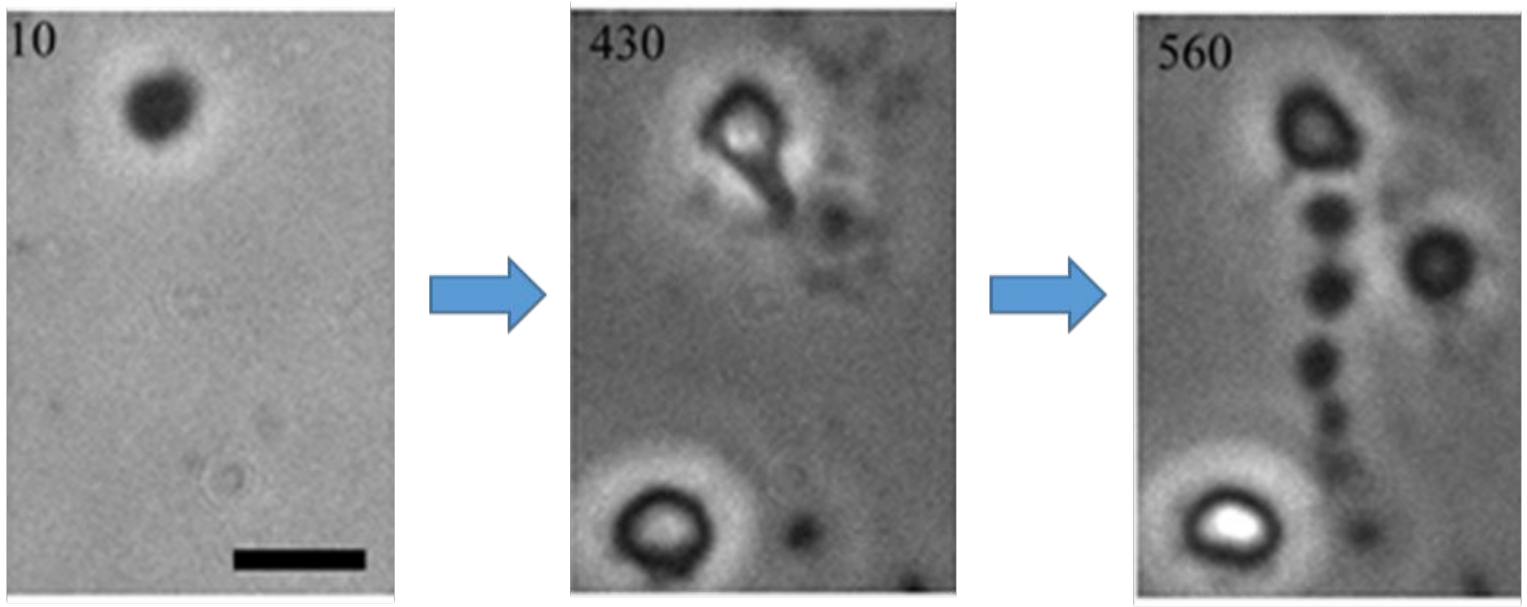


- Бактерии, утратившие способность к синтезу пептидогликана под влиянием антибиотиков или других факторов и способные размножаться, называются **L-формами** (от названия Института им. Д. Листера в Лондоне, где они впервые были изучены).
- L-формы бактерий представляют собой осмотически чувствительные шаровидные или колбовидные клетки различной величины.
- **Стабильные L-формы** не способны к реверсии в исходные бактериальные клетки.
- **Нестабильные L-формы** возвращаются в исходную бактериальную форму после удаления фактора, приведшего к изменению бактерий.
- L-формы могут образовывать многие возбудители инфекционных болезней, в том числе в организме человека или животных.
- Образование L-форм бактерий называется **L-трансформацией**.

L-form growth of *Bacillus subtilis*



Normal walled cells of rod-shaped *B. subtilis*



Time lapse sequence of L-form proliferation of *B. subtilis*

Жгутики

Жгутики выявляются при световой микроскопии только после специального окрашивания: серебрением по Морозову, окраской по Грею.

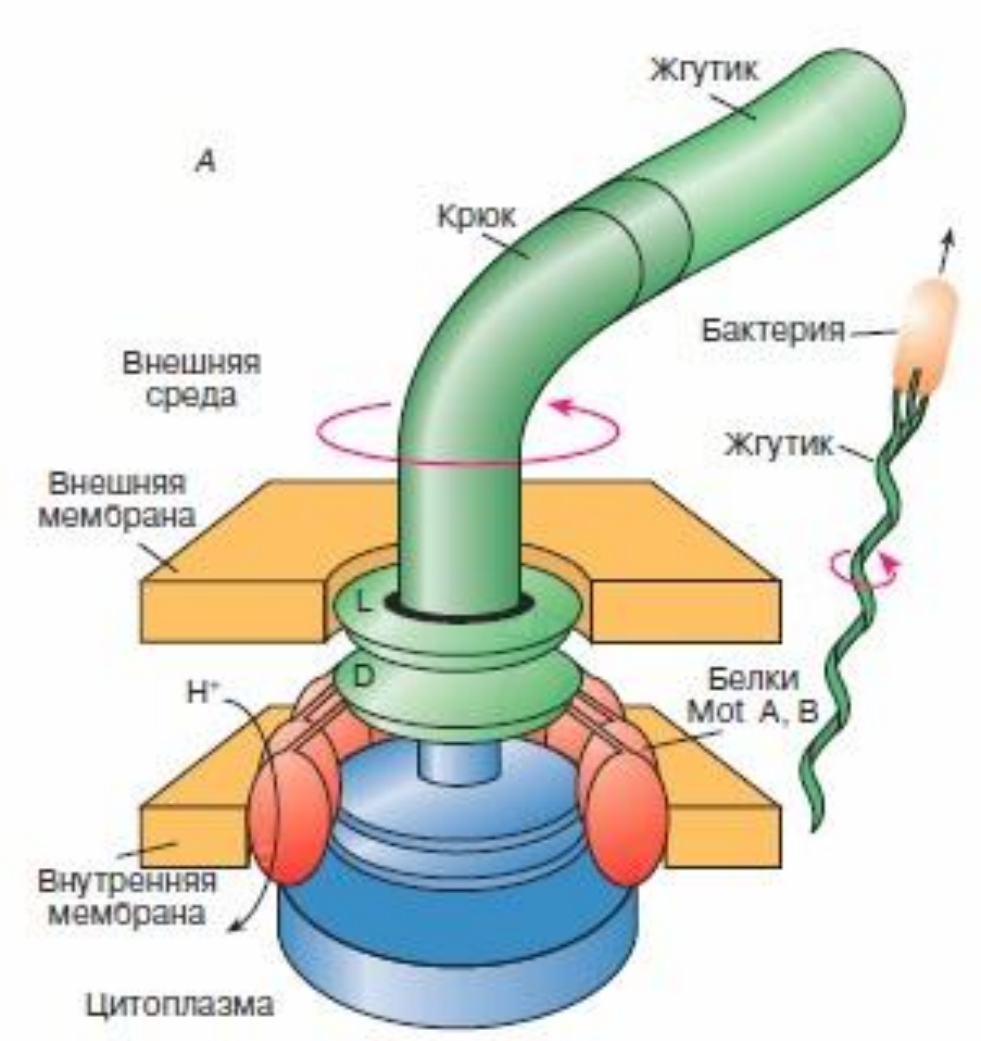
Толщина жгутиков равна 12-20 нм, длина - 3-15 мкм.

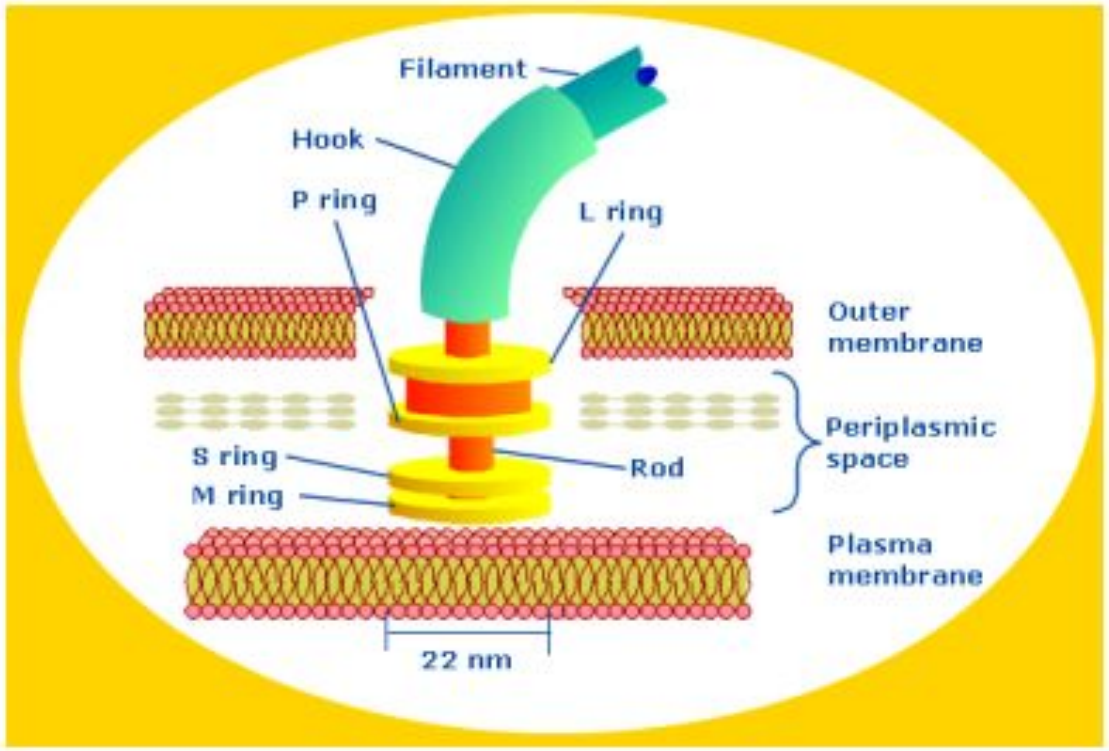
Жгутик состоит из 3 частей:

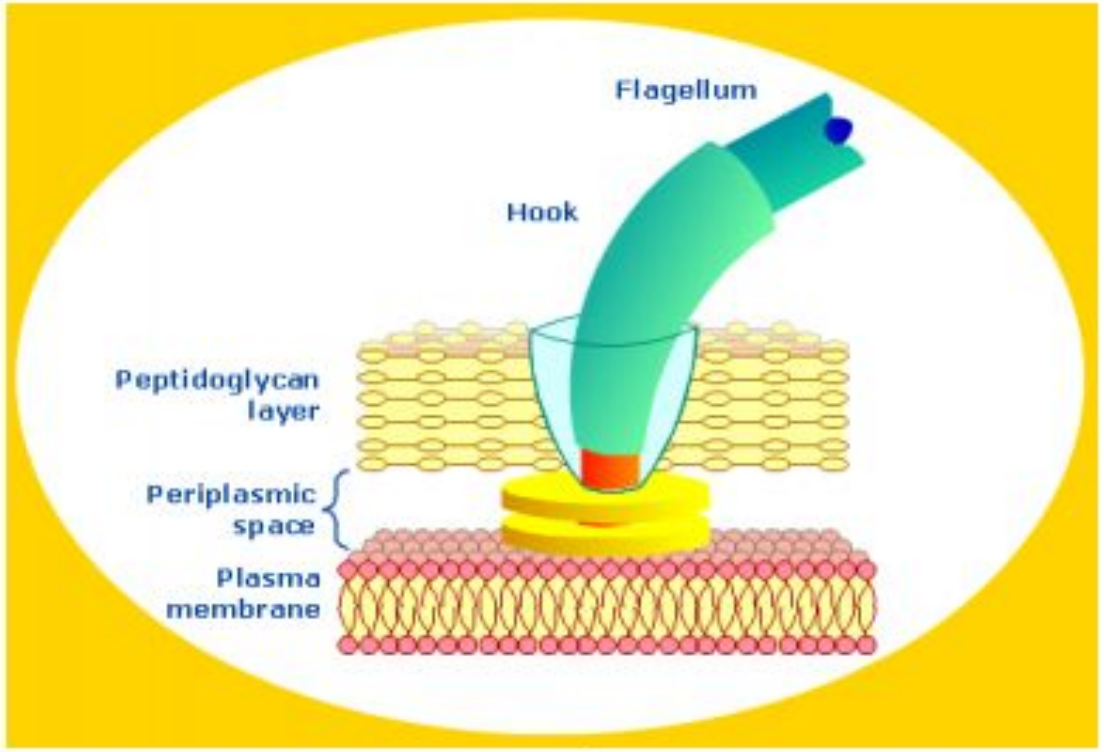
- базальное тельце;
- крюк (колено);
- спиралевидная нить (филамент, собственно жгутик).

Базальное тельце включает в себя стержень с системой дисков и белки мотора. Дисками жгутики прикреплены к цитоплазматической мембране и клеточной стенке. Базальное тельце является своего рода электромотором, вращающим жгутик.

Жгутики состоят из особого белка флагеллина (flagellum - жгутик). Этот белок обладает высокой антигенной активностью (Н-антиген бактерий). Субъединицы флагеллина закручены в виде спирали.







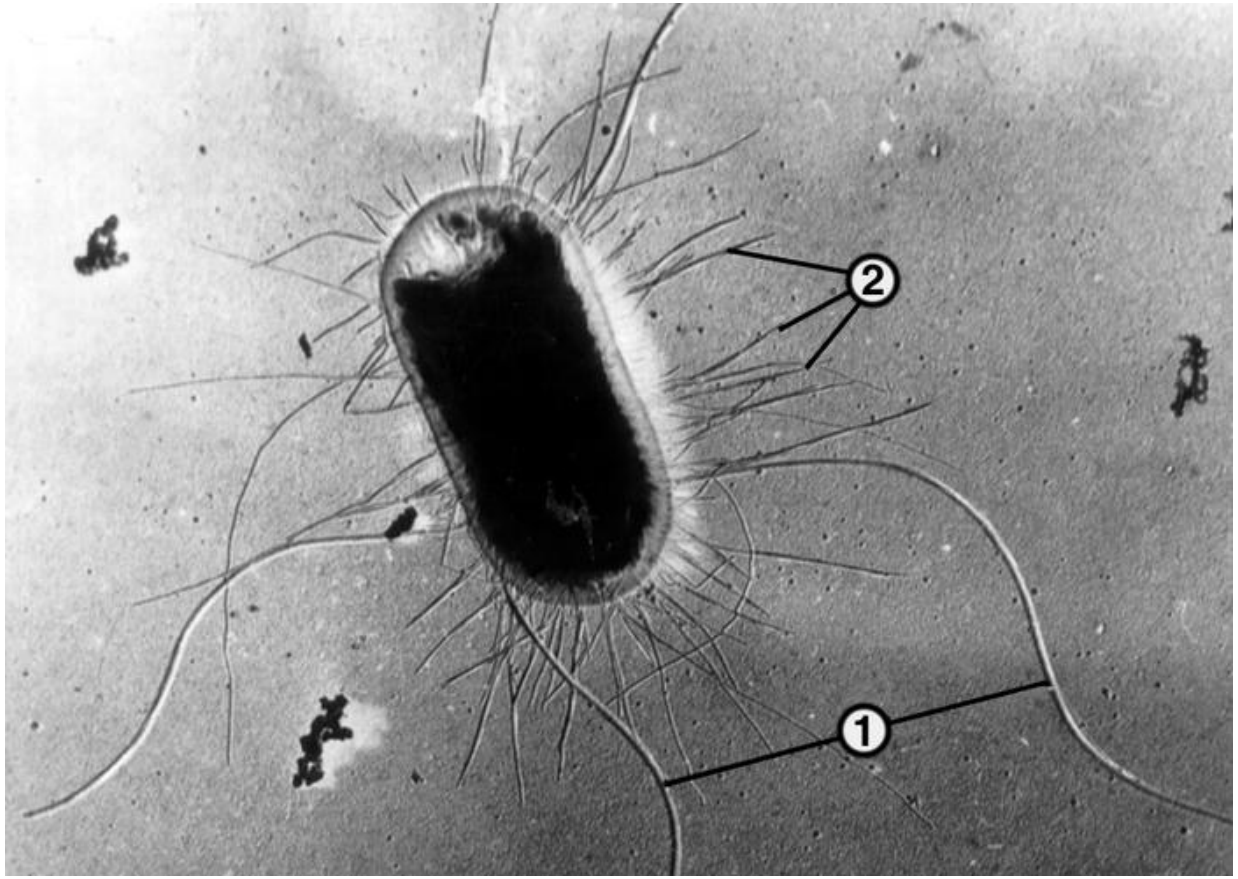
У грамотрицательных бактерий имеется две пары дисков, а у грамположительных бактерий - одна пара дисков

В зависимости от количества и локализации жгутиков выделяют следующие группы бактерий:

- **монотрихи** - бактерии, имеющие один жгутик, например, холерный вибрион;
- **лофотрихи** - бактерии, имеющие пучок жгутиков на одном из концов клетки, например, кампилобактерии;
- **амфитрихи** - бактерии, имеющие по одному жгутику или пучку жгутиков на противоположных концах клетки, например, спириллы;
- **перитрихи** - бактерии, имеющие большое количество жгутиков, покрывающих всю поверхность клетки, например, кишечная

Пили (фимбрии, ворсинки)

- Нитевидные выросты на поверхности клетки.
- Толщина 2-10 нм и длина 0,3-20 мкм.
- Располагаются либо перитрихиально, либо локализуются на одном из концов клетки.
- Берут начало от цитоплазматической мембраны и состоят из белка **пилина**.
- Белковые субъединицы закручены вокруг полой сердцевины.
- Пили встречаются как у подвижных, так и неподвижных бактерий.
- Они обладают антигенностью.
- Различают **общие пили** или пили первого типа (пили-адгезины, отвечают за адгезию бактерий к различным субстратам) и **половые пили**, пили второго типа или конъюгативные пили (F-пили).
- Общие пили детерминируются хромосомными генами, а конъюгативные пили - внехромосомным фактором фертильности (F-плазмидой). Обычно на одну клетку приходится несколько сотен пилей, среди них обнаруживается 1-3 половых пили.

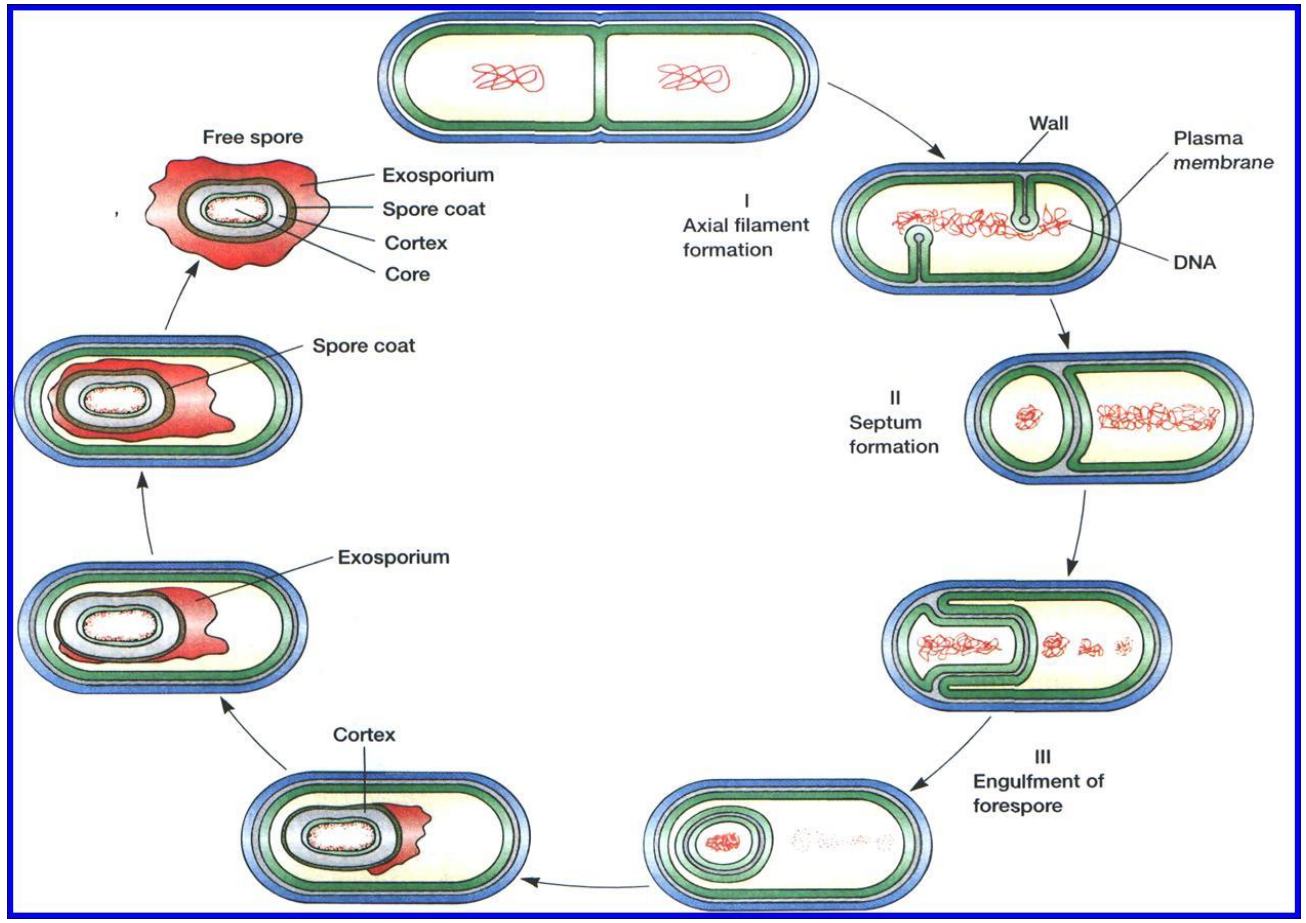


Эндоспора

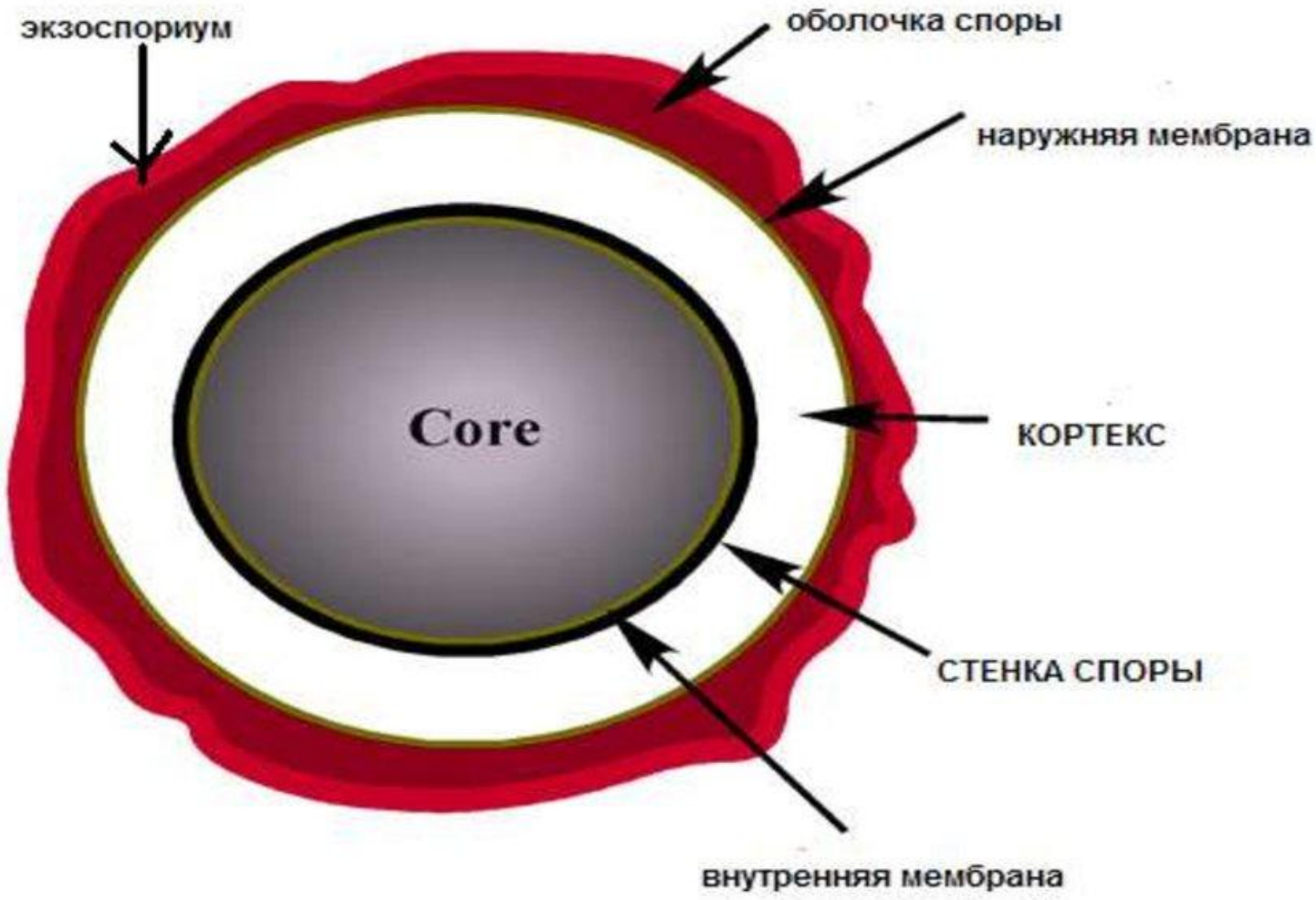
- Устойчивая к неблагоприятным воздействиям покоящаяся форма некоторых грамположительных бактерий.
- Спорообразование является формой сохранения наследственной информации в неблагоприятных условиях.
- Эндоспоры образуются внутри вегетативных клеток бактериями родов Bacillus, Clostridium, Sporolactobacillus, Sporosarcina.
- Внутри бактериальной клетки образуется одна эндоспора.

Спорообразование

- ЦМ врастает внутрь клетки и окружает нуклеоид с частью цитоплазмы, формируя **спорогенную зону**. В результате этого клетка разделяется на две части, одна из которых содержит нуклеоид и является будущей спорой.
- **Стадия предспоры** характеризуется образованием двухслойной оболочки, между мембранами которой в дальнейшем формируется толстый пептидогликановый слой - кортекс (кора).
- **Стадия созревания споры** сопровождается включением большого количества дипиколиновой кислоты и ионов кальция в споровую оболочку. На этой стадии спора покрывается толстой многослойной оболочкой.
- В последующем остатки материнской клетки лизируются и зрелая спора высвобождается в окружающую среду.



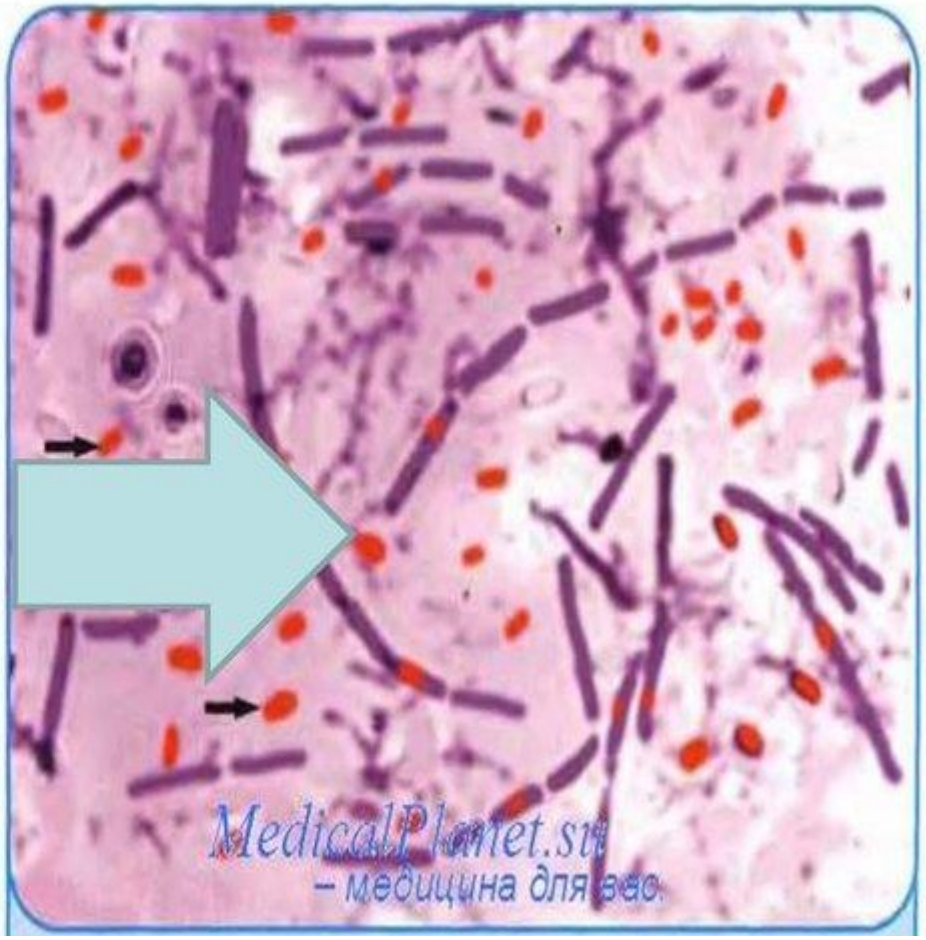
Строение споры у бактерий



Типы расположения спор:

- Субтерминальное (у возбудителя ботулизма);
- Терминальное (у возбудителя столбняка);
- Центральное (у возбудителя сибирской язвы).

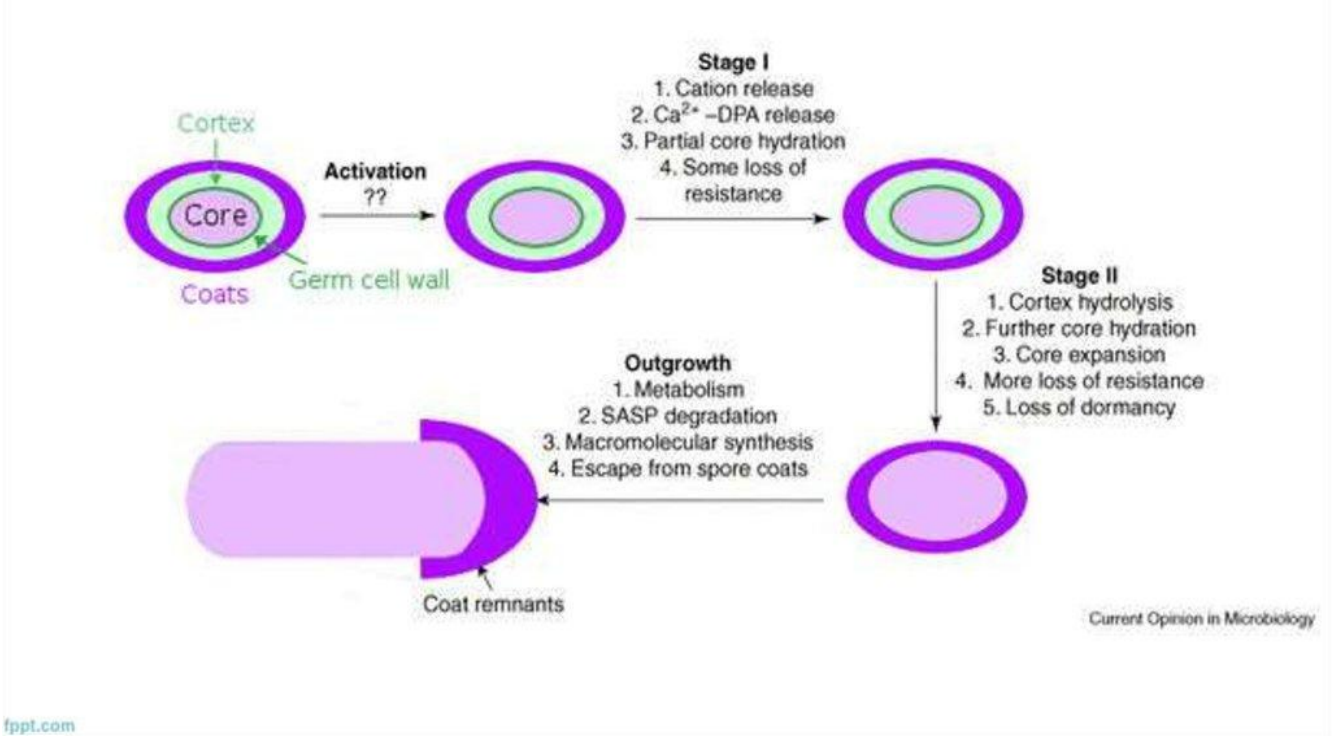
Споры кислотоустойчивы. Для их окраски используют метод Ожешко (Ауески) или Циля-Нельсена. При этом эндоспоры окрашиваются в красный цвет, а вегетативные клетки - в сине-фиолетовый цвет.



Прорастание споры

- **Стадия активации** - изменяются мембранные ферменты, проявляется дыхательная активность.
- **Стадия инициации**, при которой спора активно поглощает воду, набухает, утрачивает термоустойчивость.
- Образование зрелой вегетативной клетки происходит во время **стадии вырастания**, в течение которой происходит синтез белков и образование клеточных структур.

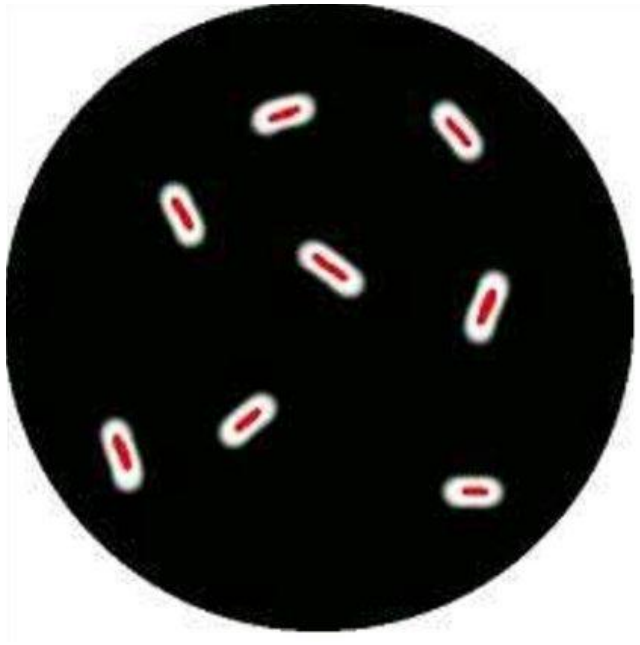
Из одной споры вырастает одна вегетативная клетка.

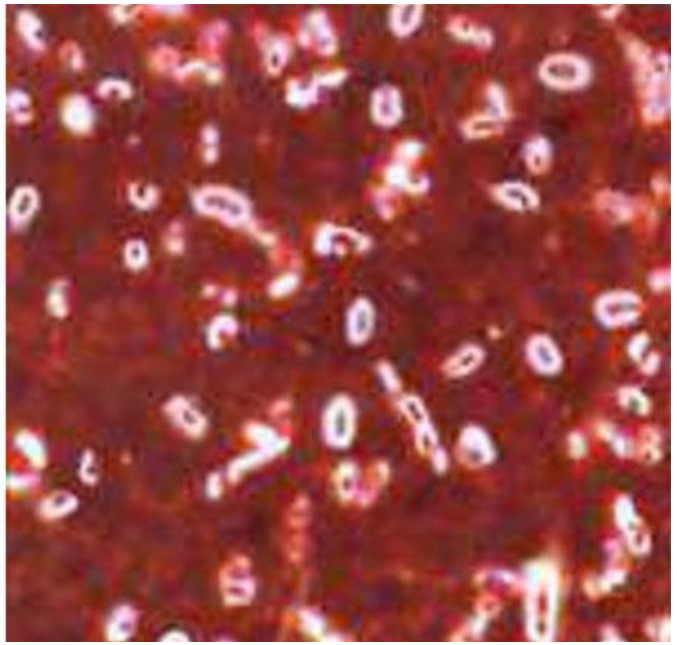


fppt.com

Окраска по Бурри-Гинсу

- Выявление капсул бактерий
- Исследуемый материал смешивают с тушью
- Окраска фуксином





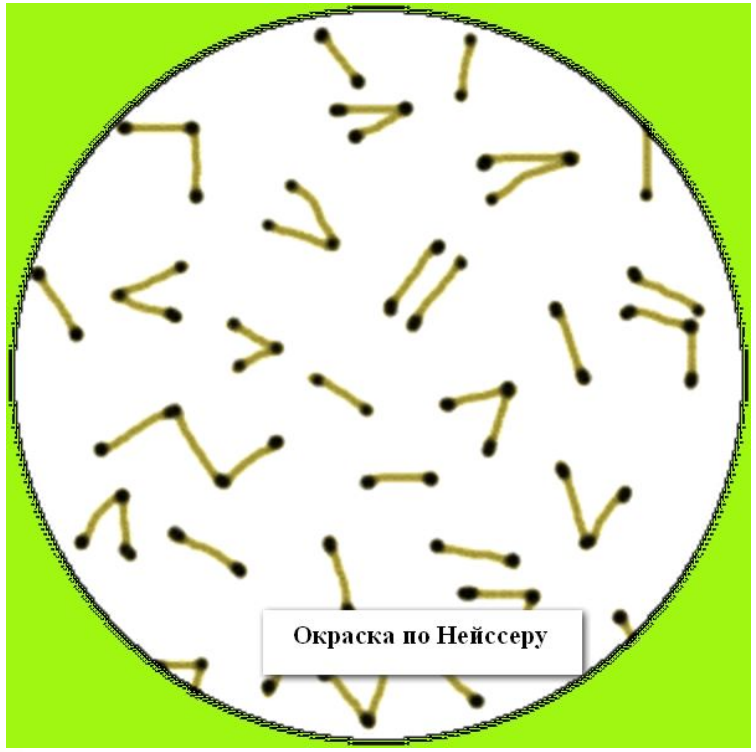
Окраска по Нейссеру

Применяется для обнаружения воллютина в клетках (Corynebacterium diphtheriae)

Техника:

- на фиксированный мазок нанести **ацетат синьки Нейссера** на 2 - 3 минуты
- добавить **раствор Люголя** на 10 - 30 секунд
- промыть водой
- мазок докрасить водным раствором **везувина** или **хризоидина** в течение 30 - 60 секунд
- промыть водой, высушить, микроскопировать

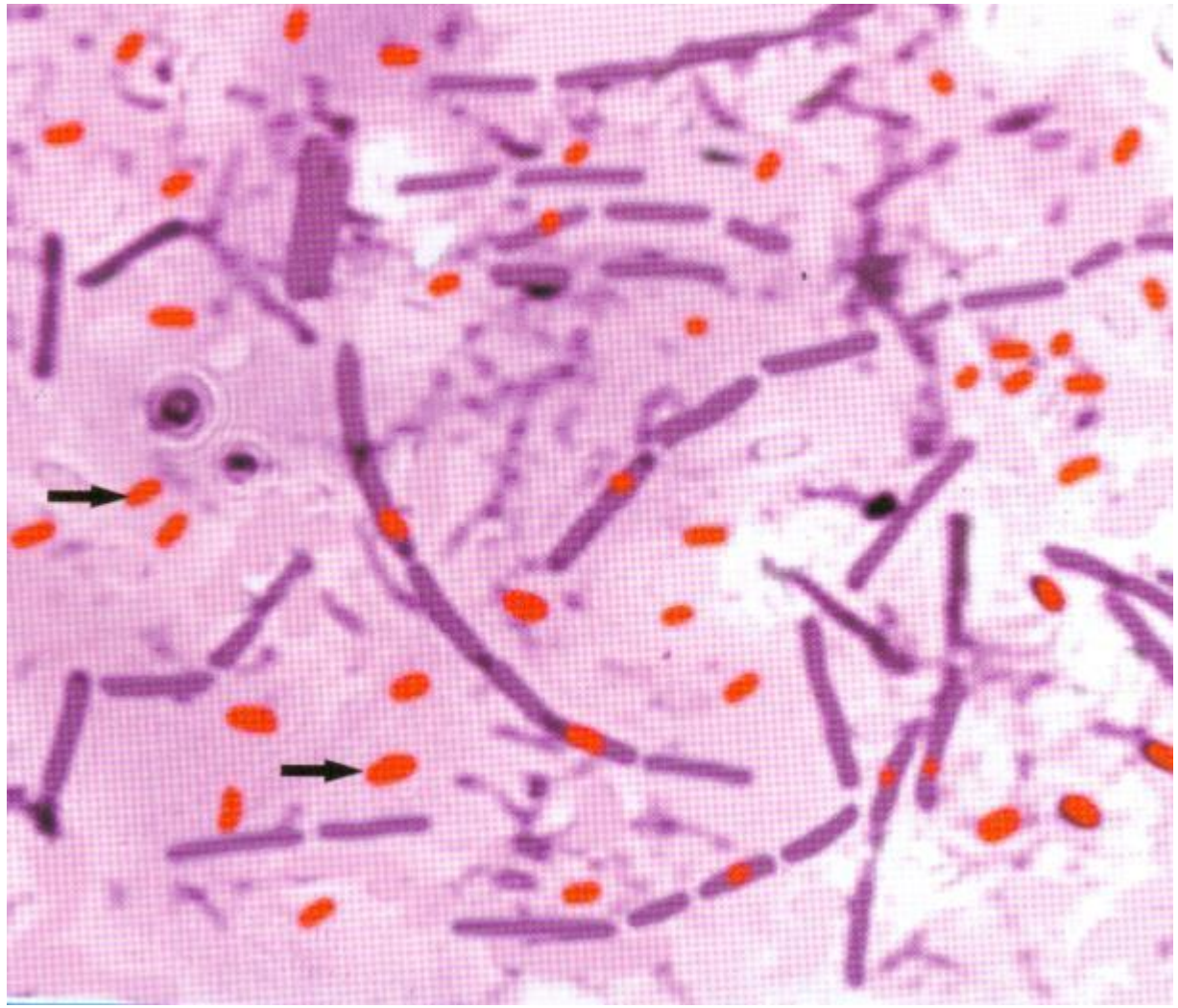
Зерна волютина имеют щелочную реакцию, поэтому воспринимают ацетат синьки, окрашиваясь в **темно-синий цвет**. Цитоплазма, имея кислую реакцию, воспринимает везувин и окрашивается в **желтый цвет**.

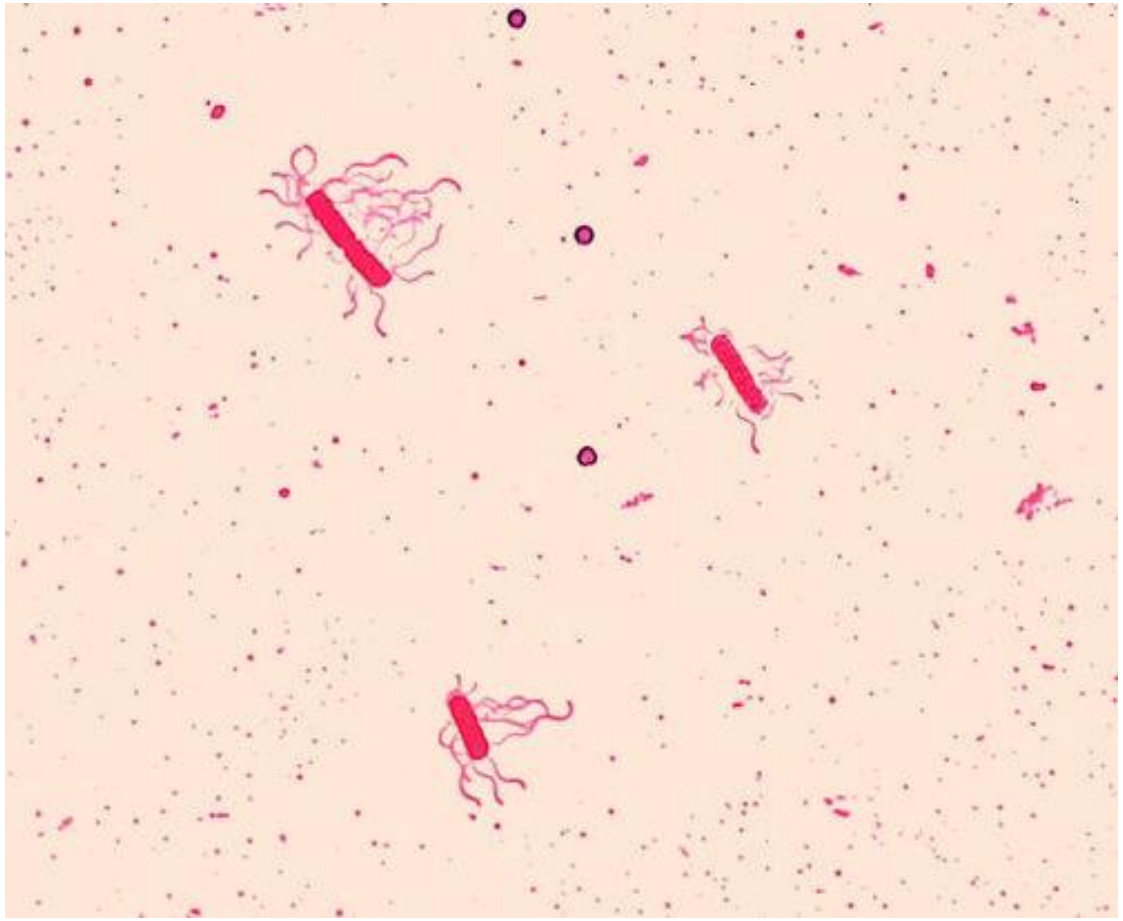


Окраска по методу Ожешки

1. На предметном стекле готовят густой мазок исследуемой культуры, высушивают его и, не фиксируя, наливают на него 0,5% раствор соляной кислоты.
2. Препарат подогревают в течение 2 минут до появления паров. Кислоту сливают.
3. Препарат промывают водой, высушивают и фиксируют.
4. На препарат помещают полоску фильтровальной бумаги и наносят несколько капель карболового фуксина Циля.
5. Препарат подогревают на пламени спиртовки до появления паров.
6. Препарат обесцвечивают 5% серной кислотой и докрашивают дополнительно метиленовой синькой в течение 3-5 минут.

Споры окрашиваются фуксином в ярко-красный цвет, а вегетативные клетки обесцвечиваются серной кислотой и окрашиваются метиленовой синькой в синий цвет.



Окраска жгутиков по Леффлеру

1. Взвесь бактерий вносят в каплю воды, нанесенную на предметное стекло, и дают высохнуть.
2. Обрабатывают 15-20 минут при комнатной температуре протравой следующего состава: 1 мл насыщенного спиртового раствора фуксина и смесь из 10 мл 25% водного раствора танина с 5 мл насыщенного водного раствора сернокислого железа.
3. Препарат тщательно промывают водой, высушивают на воздухе.
4. Докрашивают фуксином Циля в течение 3-4 минут при легком подогревании (без образования паров).
5. Затем препарат промывают водой, высушивают над пламенем горелки.