

Лекция №1

Часть 2

Ультрамикроструктура и химический состав бактериальной клетки

Документ защищен авторским знаком. Использование данного издания регулируется гражданским кодексом РФ, разделом 4 «авторское право», статьями 475-516



План лекции:

I. Капсула:

- отличие капсул от слизистого слоя;
- химический состав капсулы;
- функции капсулы;
- классификации;
- метод Бури и Бури-Гинса по обнаружению капсул.

II. Клеточная стенка:

- химический состав клеточной стенки;
- функции клеточной стенки;
- действие антибиотиков;
- классификация микроорганизмов по Грамму;

III. Жгутики:

- классификация бактерий по количеству жгутиков;
- характер и скорость движения микроорганизмов;
- виды движения бактерий;
- методы выявления жгутиков;
- пили.

IV. Цитоплазматическая мембрана:

- химический состав цитоплазматической мембраны;
- функции цитоплазматической мембраны.

V. Мезосомы:

- виды мезосом;
- функции мезосом.

VI. Цитоплазма:

- химический состав цитоплазмы;
- функция цитоплазмы.

VII. Нуклеоид:

- отличие нуклеоида бактериальной клетки от хромосом;
- плазмиды.

VIII. Рибосомы.

IX. Включения:

- виды включений.

X. Споры и процесс образования спор:

- причины спорообразования;
- бактерии, способные к спорообразованию;
- свойства споры бактерий;
- стадии образования спор;
- оболочки спор;
- факторы устойчивости спор;
- стадии прорастания спор;

XI. Методы обнаружения спор;

- окраска спор по методу Ожешко;
- кислотоустойчивые бактерии и их окраска по методу Циля-Нильсена.

I. Капсула

Капсула относится к непостоянным структурам бактериальной клетки.

Капсула – это липидно-полисахаридное и полипептидное образование, тесно связанное с поверхностью клетки упорядоченного фибриллярного строения. Капсула включает в себя еще и капсулоподобную оболочку (чехол).

Капсулоподобная оболочка = слизистая оболочка = чехол – это малоструктурированное поверхностное слизистое образование, сравнительно не прочно связанное с поверхностью клетки, которое покрывает бактериальную клетку поверх капсулы, не тесно связанное с ним.

Например, капсулу имеют стрептококки, пневмококки, клебсиеллы пневмонии, возбудитель сибирской язвы.

Отличие капсул от слизистого слоя

- ☑ наличия упорядоченных фибриллярных структур в капсуле;
- ☑ слизистый слой состоит из моноструктурных слизистых образований;
- ☑ слизистый слой легко отделяется от клетки, а капсула прочно сращена с ней.

Химический состав капсулы

- ☑ гомополисахариды и гетерополисахариды;
- ☑ полипептид (сибирская язва);
- ☑ глюканы и леваны – обеспечивают прилипание бактерии к поверхностям.

Функции капсулы

- ☑ защитная (предохраняет патогенные бактерии от фагоцитоза и других защитных механизмов);
- ☑ иммунная;
- ☑ антигенная;
- ☑ адгезионная;
- ☑ обмен веществ;
- ☑ патогенная;
- ☑ токсическая;
- ☑ дополнительный осмотический барьер.

Классификации

1. по капсулообразованию образование капсул может происходить

только в организме человека и животных	в организме и на специальных средах	постоянно
сибиреязвенная болезнь, пневмококки	чумная палочка (37°C на кровяном агаре)	пневмококки

2. по размеру толщины капсулы

микрокапсулы	макрокапсулы
толщина менее 0,2 мкм	толщина более 0,2 мкм
мукополисахариды	полисахариды
большинство бактерий	пневмококки и ряд патогенных бактерий в неблагоприятных условиях

Метод Бури по обнаружению капсул

Это простой метод обнаружения капсул, так как здесь используется только тушь. Метод основан на невосприимчивости капсулой туши, так как капсула содержит большое количество воды. При микроскопировании видны прозрачные капсулы, красное содержимое бактериальной клетки, темный фре и четко темная граница между капсулой и средой.

1) **Приготовление фиксированного мазка.**

- а) Обезжиривание покровного стекла кусочком мыла и вытереть его фильтровальной бумагой.
- б) Прокаливание бактериальной петли в пламени спиртовки.
- в) Прокаливание горлышка пробирки.
- г) Взятие бактериальной петлей образца культуры.
- д) Нанесение культуры на предметное стекло.
- е) Прокаливания горлышка пробирки с культурой и закрытие ее.
- ж) Прокаливание бактериальной петли.

2) **Негативное контрастирование по Бури.** Водный раствор туши 1:3 на 1-2 минуты.

3) **Высушивание.** Удаление воды из препарата фильтровальной бумагой.

4) **Фиксация.** Обезвреживание микроорганизмов, прикрепление их к стеклу для лучшего окрашивания путем прокалывания предметного стекла с микроорганизмом над спиртовкой 3-4 секунды.

Метод Бури-Гинса по обнаружению капсул

Это сложный метод обнаружения капсул, потому что здесь используются два красителя. Метод основан на невосприимчивости капсулой красителя. Так как капсула содержит большое количество воды, то при микроскопировании видны светлые капсулы микроорганизма на темном фоне.

- 1) **Приготовление фиксированного мазка.**
 - а) Обезжиривание покровного стекла кусочком мыла и вытереть его фильтровальной бумагой.
 - б) Прокаливание бактериальной петли в пламени спиртовки.
 - в) Прокаливание горлышка пробирки.
 - г) Взятие бактериальной петлей образца культуры.
 - д) Нанесение культуры на предметное стекло.
 - е) Прокаливания горлышка пробирки с культурой и закрытие ее.
 - ж) Прокаливание бактериальной петли.
- 2) **Негативное контрастирование по Бури.** Водный раствор туши 1:3 на 1-2 минуты.
- 3) **Высушивание.** Удаление воды из препарата фильтровальной бумагой.
- 4) **Фиксация.** Обезвреживание микроорганизмов, прикрепление их к стеклу для лучшего окрашивания путем прокаливания предметного стекла с микроорганизмом над спиртовкой 3-4 секунды.
- 5) **Окраска микробных клеток по Гинсу.** Водный раствор фуксина на 1-2 минуты.
- 6) **Промывка.** Осуществляется большим количеством воды.

II. Клеточная стенка

Клеточная стенка – это постоянный компонент бактериальной клетки, представленный биогетерополимером, покрывающим всю поверхность клетки

Химический состав клеточной стенки

- ☑ Пептидогликан – это параллельные полисахаридные (гликановые) цепи, состоящие из чередующихся звеньев N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, связанные ковалентно с тетрапептидом, в состав которого входят четыре разные аминокислоты, в том числе лизин, либо диаминопимелиновая кислота (только у бактерий).
- ☑ Органические кислоты. Глицин, тейхоевая кислоты характерны для грам +, а у грам – имеются ацетилмурановая кислота

- ☑ Липопротеиды, которые образуют глобулярный слой в результате ковалентной связи с пептидогликаном
- ☑ Фосфолипиды, покрывающие липопротеиды пластинчатой мембраноподобной структурой, в состав которой входят еще липополисахариды и белки.
- ☑ Липополисахариды. Имеют три звена: основное (базисное), к одному концу которого присоединен липид (второе звено), а к противоположному – повторяющиеся звенья сахаров (третье звено). Базисное звено представляет собой полисахарид, включающий в качестве мономеров глюкозу, галактозу, маннозу, рамнозу, N-ацетилглюкозамин, 2-кето-3-дезоксиктонат и редко абеквозу, колитозу, тивелозу.
- ☑ Белки. Являются своеобразными выводными каналами в процессе диффузии химических веществ из внешней среды в микробную клетку в составе белков-поринов.

Функции клеточной стенки

- ☑ цитоскелетная (придает форму бактерии);
- ☑ защитная (предохраняет патогенные бактерии от фагоцитоза и других защитных механизмов и воздействий окружающей среды);
- ☑ рецепторная (содержит на своей поверхности ряд рецепторов для прикрепления фагов, антибиотиков и другие химически соединения);
- ☑ фильтрационная (обмен продуктами метаболизма и питательными веществами, ионами, водой);
- ☑ ригидность и эластичность (за счет пептидогликана);
- ☑ антигенная;
- ☑ токсическая (выделяет метаболиты, являющиеся токсинами для хозяина);
- ☑ обмен веществ.

Действие антибиотиков

Пептидогликан является «мишенью» для действия некоторых антибиотиков (пенициллинов и лизоцима). Пенициллин нарушает образование тетрапептидных связей, а лизоцим разрушает гликозидные связи между мурамовой кислотой и ацетилглюкозаминном. При действии пенициллина на растущую бактериальную культуру образуются безоболочечные формы бактерий, лишенные клеточной стенки, которые называют протопласты, сферопласты и L-формы.

Протопласты – это формы бактерий, которые под действие пенициллинов полностью теряют клеточную стенку. В обычной изотонической среде подвергаются плазмолизу.

Сферопласты - это формы бактерий, которые под действие пенициллинов частично теряют клеточную стенку и имеют форму сферы, так как полностью отсутствует пептидогликан. В обычной изотонической среде подвергаются плазмолизу, а в гипертонической среде (раствор сахарозы или хлорида натрия) клетки сохраняют слабую метаболическую активность, но утрачивают способность к размножению.

L – формы – это такие бактерии, которые при действии пенициллина полностью или частично утрачивают клеточную стенку, но сохраняют способность к размножению. Название дано в честь института имени Д. Листера (Англия), в котором они были первые выделены. L-формы могут возникать в организме человека в результате длительного лечения некоторыми антибиотиками (пенициллином).

Нестабильные L-формы – это такие виды L-форм, которые способны к реверсии и могут синтезировать пептидогликан клеточной стенки.

Стабильные L-формы – это такие виды L-форм, которые не способны к реверсии и не могут синтезировать пептидогликан клеточной стенки.

Классификация микроорганизмов по Граму

Конец 19 века, Грам

1. **грам +** – это бактерии, клеточная стенка которых удерживает анилиновые красители, не обесцвечиваются этиловым спиртом.
 - a. *красители*: генцианвиолет.
 - b. *клеточная стенка*:
 - i. *толщина*: 10-25 нм;
 - ii. *структура стенки*: пептид связан через пептидный мостик из 5 остатков глицина, а пептидогликан связан с тейхоевыми и липотейхоевыми кислотами, за счет чего он имеет многослойную структуру;
 - iii. *пептидогликан*: есть, до 95%;
 - iv. *тейхоевые кислоты*: есть;
 - v. *белки*: есть;
 - vi. *липиды*: есть;
 - vii. *полисахариды*: нет.
 - c. *ферменты*: выделяются непосредственно в окружающую среду.
2. **грам –** – это бактерии, клеточная стенка которых не удерживает анилиновые красители и обесцвечивается спиртом.
 - a. *красители*: фуксин.
 - b. *клеточная стенка*:
 - i. *толщина*: 9-10 нм;

- ii. *структура стенки*: ацетилмурановые кислоты связаны через 2 однотипных тетрапептида, а пептидогликан однослойен и покрыт наружной мембраной с мозаичным строением, в состав которой входит липопротеид, образующий глобулярный слой в результате ковалентной связи с пептидогликаном;
 - iii. *пептидогликан*: есть, 5-10%;
 - iv. *тейхоевые кислоты*: нет;
 - v. *белки*: есть, 25%;
 - vi. *липиды*: есть, много;
 - vii. *полисахариды*: есть глюкоза, галактоза, манноза, рамноза, абеквоза, колитоза, тивелоза, N-ацетилглюкозамин, 2-кето-3-дезоксиктонат.
- c. *ферменты*: находятся в периплазматическом пространстве.

III. Жгутики

Жгутики относятся к необязательным структурам бактериальной клетки. Жгутики состоят из флагелина. **Флагелин** – это белок, который по своей структуре относится к сократимым белкам типа миозина.

Базальное тельце – это компонент, к которому прикрепляются жгутики. Он состоит из системы нескольких дисков, вмонтированных в цитоплазматическую мембрану и клеточную стенку.

Классификации бактерий по количеству жгутиков

Монотрихи – это вид бактерий, которые имеют на одном из полюсов клетки только один жгутик. Например, холерный вибрион.

Лофотрихи – это вид бактерий, которые имеют пучок жгутиков.

Амфитрихи – это вид бактерий, которые имеют жгутики расположенные на обоих полюсах клетки.

Перитрихи – это вид бактерий, которые имеют жгутики по всей ее поверхности. Например, кишечная палочка и протей.

Характер и скорость движения микроорганизмов зависят от

- ☑ возраста культуры (чем старше культура, тем медленнее движение микроорганизмов);
- ☑ количества и расположения жгутиков;
- ☑ расположения бактерии;
- ☑ состава и свойств питательной среды (вязкость, кислотность и температуры);
- ☑ от наличия химических веществ в среде.

Виды движения бактерий

В основном все бактерии движутся за счет вращательных движений жгутиков, подобно корабельному винту. Например, монотрихи и лофотрихи.

1. Беспорядочное движение

2. Направленное движение (хемотаксис, аэротаксис, фототаксис)

Таксис – это направленное движение бактериальной клетки за счет жгутиков.

Хемотаксиса – это вид направленного движения, обусловленного градиентом концентрации разных химических веществ.

Аэротаксис – это вид направленного движения, обусловленного разной концентрацией кислорода

Фототаксис – это вид направленного движения, обусловленного световым потоком, воздействующим на бактерии.

Методы выявления жгутиков

Прямой метод – это такой метод, при котором непосредственно выявляются споры бактерий либо при их окраске, либо при их контрастировании. Например, серебрение по методу Морозова, метод Леффлера.

Косвенные метод – это такой метод, который направлен на непосредственное выявление других свойств, структур и процессов микроорганизма, но в процессе которого можно наблюдать необходимое явление. Например, метод висячей и раздавленной капли (тело бактерии темно-коричневого цвета на светлом фоне), укол в столб полужидкого агара = «роение протей» (рост по Шукевичу).

Пили

Пили = ворсинки = фимбрии – тонкие полые (цилиндрические) сферически закрученные по спирали нити белковой природы длиной 0,3–10 мкм, толщиной 10–20 нм, покрывающие поверхность бактериальных клеток.

Отличие пилей от жгутиков

заключается в том, что пили выполняют локомоторную функцию.

Виды пилей

По функциональному назначению пили делятся на несколько типов.

1. **Пили 1 общего типа**

а. *функции*: выполняют прикрепление (адгезию) бактерий к чувствительным клеткам.

б. *количество*: от нескольких сотен до нескольких тысяч.

2. **Пили 2 типа = конъюгативные = половые = sex пили**

- а. *функции*: участвуют в конъюгации бактерий, обеспечивают перенос части генетического материала от донора к реципиенту, участвуют в адсорбции фагов РНК-содержащих типов, транспорте метаболитов.
- б. *количество*: 1 – 4 штуки.

IV. Цитоплазматическая мембрана

Цитоплазматическая мембрана – это жизненно необходимый структурный компонент бактериальной клетки, который ограничивает протопласт, располагаясь непосредственно под клеточной стенкой и состоит из трех слоев, включая двойной слой фосфолипидов. Двойной слой фосфолипидов пронизан белковыми глобулинами, которые обеспечивают транспорт веществ в бактериальную клетку.

Химическая структура цитоплазматической мембраны

- ☑ липопротейн: 15–30% липидов (нейтральные липиды или фосфолипиды) и 50–70 % протеинов;
- ☑ углеводы 2–5%;
- ☑ незначительное количество РНК;
- ☑ гликолипиды (бактерии);
- ☑ стеролы (микоплазмы).

Классификация мембранных белков

1. **Структурные белки** – это белки мембраны, которые входят в состав мембран.
2. **Функциональные белки** – это белки мембраны или правильнее ферменты, которые участвуют в биосинтезе разных компонентов клеточной стенки, окислительно-восстановительные ферменты, пермеазы.

Функции цитоплазматической мембраны

- ☑ транспорт веществ в бактериальную клетку;
- ☑ регуляция поступления в клетку метаболитов и ионов;
- ☑ участие в метаболизме;
- ☑ участие в репликации ДНК;
- ☑ участие в спорообразовании;

V. Мезосомы

Мезосомы – это одни из обязательных структур бактериальной клетки, которые являются производными цитоплазматической мембраны.

Виды мезосом

Они имеют неодинаковое строение у разных бактерий, располагаясь в разных частях клетки.

- ☑ в виде концентрических мембран
- ☑ в виде пузырьков;
- ☑ в виде трубочек;
- ☑ в форме петли (характерны для грам –).

Функции мезосом

- ☑ участвуют в делении клетки;
- ☑ спорообразовании.

VI. Цитоплазма

Цитоплазма – это внутренняя среда организма, представляющая собой сложную коллоидную систему.

Химический состав цитоплазмы

- ☑ воды (около 75%);
- ☑ минеральных соединений;
- ☑ белков;
- ☑ РНК или ДНК, которые входят в состав органелл нуклеоида, рибосом, мезосом, включений.

Функции цитоплазмы

- ☑ обмен веществ;
- ☑ регуляция обмена веществ

VII. Нуклеотид

Нуклеотид - это молекула ДНК или РНК, которая отвечает за размножение, развитие и синтез необходимых протеинов (ферментов, структурных белков) для обеспечения жизнедеятельности и функционирования бактериальной клетки.

Обличие нуклеоида бактериальной клетки от хромосом

- ☑ нет ядерной мембраны;
- ☑ не содержит хромосом;
- ☑ не делится митозом;
- ☑ отсутствуют основные белки — гистоны;
- ☑ замкнутая кольцевая молекула ДНК с молекулярной массой (2—3) • 10⁹

Плазмиды

Плазмиды - это автономные кольцевые молекулы двунитевой ДНК с меньшей молекулярной массой, в которых закодирована наследственная информация, но которая не является жизненно необходимой для бактериальной клетки.

VIII. Рибосомы

Рибосомы – это обязательная белоксинтезирующая структура бактериальной клетки.

Выделяют большую 50S и малую 30S субъединицы рибосом размером 2 нм, которые при объединении образуют одну субъединицу 70S. В отличие от клеток эукариотов рибосомы бактерий не объединены в эндоплазматическую сеть. Бактериальные рибосомы могут стать «мишенью» для действия многих антибиотиков.

IX. Включения

Включения – это необязательные структуры бактериальной клетки, которые являются продуктами метаболизма микроорганизмов и располагаются в их цитоплазме, используются в качестве запасных питательных веществ.

Виды включений

- ☑ гликоген;
- ☑ крахмал;
- ☑ сера;
- ☑ полифосфат (волютин)

Х. Споры и образование спор

Споры – это форма сохранения наследственной информации бактериальной клетки в неблагоприятных условиях окружающей среды, служащая для сохранения вида.

Причины спорообразования

- ☑ сухость или чрезмерная влажность;
- ☑ слишком низкая или высокая температура;
- ☑ критические колебания рН среды;
- ☑ различные химические вещества;
- ☑ попадание вегетативных форм в почву;
- ☑ старение культуры;
- ☑ обеднение среды.

Бактерии, способные к спорообразованию

- ☑ Род *Bacillus* (патогенные) – палочковидная форма. Споры располагаются в центре, продольный диаметр меньше поперечного.
- ☑ Род *Clostridium* (патогенные) – овальная форма. Споры располагаются в центре и на конце, продольный размер преобладает над поперечным.
- ☑ Род *Sporosarcina* (непатогенные) – шаровидная форма. Споры располагаются посередине.

Свойства споры бактерий

1. термоустойчивость;
2. высокая устойчивость к действию химических веществ;
3. высокая устойчивость к действию медицинских препаратов;
4. высокая устойчивость к действию физических факторов;
5. устойчивость к действию прямых солнечных лучей ($\lambda\nu$);
6. устойчивость к кратковременному кипячению;
7. устойчивость к растворам дезинфектантов небольшой концентрации.

Стадии образования спор

1. Образование спорогенной зоны.

Внутри бактериальной клетки, представляющей собой уплотненный участок цитоплазмы с расположенным в нем нуклеоидом.

2. Образование проспоры.

Происходит изолирование спорогенной зоны от остальной части цитоплазмы с помощью врастающей внутрь клетки цитоплазматической мембраны.

Между внутренним и наружным слоями последней образуется кортекс, состоящий из особого пептидогликана.

3. Стадия зрелой споры.

Внешняя сторона мембраны покрывается плотной оболочкой, в состав которой входят белки, липиды и другие соединения, не встречающиеся у вегетативных клеток (дипиколиновая кислота, обуславливающая термоустойчивость споры)

Отмирание вегетативной части клетки, и спора сохраняется во внешней среде в течение длительных сроков.

Оболочки споры

Выделяют ряд оболочек споры, которые защищают споры от воздействия неблагоприятных для споры факторов окружающей среды.

1. *Эндоспориум.*
2. *Наружная оболочка споры.*
3. *Наружная цитоплазма.*
4. *Кортекс.* Состоит из соединения пептидогликана с дипикалиновой кислотой.
5. *Внутренняя плазматическая оболочка.*
6. *Нуклеоид (сердцевина).*

Факторы устойчивости спор

- ☑ низкое содержание воды;
- ☑ повышенное содержание ионов кальция;
- ☑ строение споры;
- ☑ оболочки споры;

Стадии прорастания спор

В благоприятных условиях спора прорастает в вегетативную форму.

1. *Набухание.* Увеличение в бактериальной клетке количества воды.
2. *Завершение синтеза нуклеиновых кислот.* Активирование ферментов, участвующих в энергетическом и пластическом метаболизме.
3. *Разрушение оболочки, выход ростовой трубки.* Разрушение оболочки споры и выход из нее ростовой трубки, после чего завершается синтез клеточной стенки и сформировавшаяся вегетативная клетка начинает делиться.

Прорастание споры происходит в течение 4—5 ч, в то время как образование спор продолжается до 18—20 ч.

XI. Методы обнаружения спор

Способность бактерий образовывать споры, различающиеся по форме, размерам и локализации в клетке, является таксономическим признаком, который используется для их дифференцировки и идентификации. Выделяют простые и сложные методы обнаружения спор.

Простые методы окраски бактерий – применяется один краситель, а в **сложных методах окраски** используют несколько красителей, дифференцирующих средств.

Окраска спор по методу Ожешки

Для микроскопического изучения используются фиксированные препараты.

- 1) **Протравливание** (HCl 0,5% на 2-3 минуты прогреть над пламенем спиртовки. При добавлении к культуре микроорганизмов со спорами протравливающих средств происходит размягчение и разрыхление оболочек споры, чтобы легче проходили красители).
- 2) **Промывка** (Промывание прохладной или холодной водой необходимо для того, чтобы убрать протравливающие средства).
- 3) **Фиксация** (обезвреживание микроорганизмов, прикрепление их к стеклу, чтобы не смылись водой, для лучшего окрашивания путем прокаливания предметного стекла с микроорганизмом над спиртовкой 3-4 секунды).
- 4) **Нанесение основного красителя** (На препарат наносят карболовый раствор фуксина для прокрашивания спор на 3-5 минут). В итоге мазок полностью становится красным.
- 5) **Нанесение дифференцирующего средства** (5,0% раствор H₂SO₄ на 2 минуты для обесцвечивания раствора фуксина).
- 6) **Промывка** (удаление раствора серной кислоты из препарата).
- 7) **Нанесение дополнительного красителя** (нанесение метиленового синего для прокрашивания фона и вегетативных форм на 3-5 минут).
- 8) **Промывка** (удаление раствора красителя из препарата).
- 9) **Микроскопирование.**

В итоге: на синем фоне видны синие вегетативные формы и споры красного цвета.

Кислотоустойчивые бактерии и их окраска по методу Циля-Нильсена

Для микроскопического изучения используются фиксированные препараты.

- 1) **Готовится фиксированный мазок.**
- 2) **Нанесение основного красителя** (На препарат наносят карболовый раствор фуксина для прокрашивания спор на 3-5 минут). В итоге мазок полностью становится красным.
- 3) **Промывка** (удаление раствора красителя из препарата холодной водой).
- 4) **Нанесение дифференцирующего средства** (5,0% раствор H_2SO_4 на 1-2 минуты для обесцвечивания раствора фуксина). В качестве дифференцирующего средства используются: 5,0% раствор H_2SO_4 , раствор HCl , раствор $HCl:C_2H_5OH$.
- 5) **Промывка** (удаление раствора серной кислоты из препарата).
- 6) **Нанесение дополнительного красителя** (нанесение метиленового синего для прокрашивания фона и вегетативных форм на 3-5 минут).
- 7) **Промывка** (удаление раствора красителя из препарата).
- 8) **Микроскопирование.**

В итоге: на синем фоне видны синие кислотонеустойчивые бактерии, а кислотоустойчивые - красного цвета.