

Занятие 2

Ультраструктура бактериальной клетки. Методы Грама и Нейссера. Кислотоустойчивые бактерии, их окраска по Цилю-Нильсену. Споры, окраска спор методом Ожешко. Капсула, выявление капсулы по методу Гинс-Бурри. Жгутики. Методы изучения подвижности микробов (препараты «раздавленная» и «висячая» капля, витальная окраска).

План занятия:

1. Ультраструктура бактериальной клетки. Постоянные (нуклеоид, цитоплазма, рибосомы, клеточная оболочка – цитоплазматическая мембрана, клеточная стенка, слизистый слой) и непостоянные (капсула, внутриклеточные включения, жгутики, плазмиды, пили и споры) компоненты клетки.
2. Строение клеточной стенки бактерий, грамположительные и грамотрицательные бактерии.
3. Этапы окраски по методу Грама.
4. Волютиновые гранулы и выявление их методом Нейссера.
5. Особенности строения кислотоустойчивых бактерий. Техника окраски кислотоустойчивых бактерий по методу Циля-Нильсена.
6. Споры, условия и этапы образования спор. Техника окраски спор по методу Ожешко
7. Капсула, микрокапсула. Капсулообразующие бактерии, химический состав, структура и значение капсулы. Обнаружение капсулы по методу Гинс-Бурри.
8. Подвижные бактерии. Строение, функция и расположение жгутиков. Пили, их значение.
9. Изучение подвижности микробов в препаратах, приготовленных по методу «раздавленная» и «висячая» капля. Метод витального окрашивания.

Структура бактерий хорошо изучена с помощью электронной микроскопии целых клеток и их ультратонких срезов, а также других методов. Бактериальную клетку окружает оболочка, состоящая из клеточной стенки и цитоплазматической мембраны. Под оболочкой находится протоплазма, состоящая из цитоплазмы с включениями, и ядра, называемого нуклеоидом. Имеются дополнительные структуры: капсула, микрокапсула, слизь, жгутики, пили. *Клеточная стенка* — прочная, упругая структура, придающая бактерии определенную форму и вместе с подлежащей цитоплазматической мембраной «сдерживающая» высокое осмотическое давление в бактериальной клетке. Она участвует в процессе деления клетки и транспорте метаболитов, имеет рецепторы для бактериофагов, бактериоцинов и различных веществ. Наиболее толстая клеточная стенка у грамположительных бактерий, она может достигать 50 нм и более.

В *клеточной стенке грамположительных бактерий* содержится небольшое количество полисахаридов, липидов, белков. Основным компонентом клеточной стенки этих бактерий является многослойный *пептидогликан* (муреин, мукопептид), составляющий 40–90% массы клеточной стенки. С пептидогликаном грамположительных бактерий ковалентно связаны *тейхоевые кислоты*,

являющиеся полимерами глицеролфосфата и рибитолфосфата. Имеются также **липотейхоевые кислоты**, которые гидрофобно связаны с цитоплазматической мембраной. Тейхоевые и липотейхоевые кислоты участвуют в делении клетки, в регуляции синтеза и распада клеточной стенки, в адгезии на клетках организма при инфицировании. Форму и прочность бактериям придает жесткая волокнистая структура многослойного, с поперечными пептидными сшивками пептидогликана.

Пептидогликан представлен параллельно расположенными молекулами *гликана*, состоящего из повторяющихся остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенных гликозидной связью. Эти связи разрывает лизоцим являющийся ацетилмурамидазой. Гликановые молекулы соединены через N-ацетилмурамовую кислоту поперечной пептидной связью из четырех аминокислот (*тетрапептида*). Отсюда и название этого полимера — пептидогликан. Основу пептидной связи пептидогликана грамотрицательных бактерий составляют тетрапептиды, состоящие из чередующихся L- и D-аминокислот, например L-аланин — D-глутаминовая кислота — мезодиаминопимелиновая кислота — D-аланин.

Тетрапептиды пептидогликана у грамположительных бактерий соединены друг с другом полипептидными цепочками из пяти остатков глицина (пентаглицина). Вместо мезодиаминопимелиновой кислоты они часто содержат лизин.

Элементы гликана (NAG и NAM) и аминокислоты тетрапептида (мезодиаминопимелиновая и D-глутаминовая кислоты, D-аланин) считаются отличительной особенностью бактерий, поскольку отсутствуют у животных и человека.

В состав клеточной стенки **грамотрицательных бактерий** входит наружная мембрана, связанная посредством липопroteина с подлежащим слоем пептидогликана. Наружная мембрана имеет вид волнообразной трехслойной структуры, сходной с цитоплазматической мембраной. Основным компонентом этих мембран является двойной слой липидов.

Наружная мембрана — мозаичная структура, состоящая из липополисахаридов, фосфолипидов и белков. Внутренний слой ее представлен фосфолипидами, а в наружном слое расположен липополисахарид (ЛПС). ЛПС наружной мембраны состоит из трех фрагментов:

- липида А — консервативной структуры, практически одинаковой у грамотрицательных бактерий;
- ядра, или стержневой, коровой части (от лат. core — ядро), относительно консервативного олигосахарида;
- высоковариабельной O-специфической цепи полисахарида, образованной повторяющимися идентичными олигосахаридными последовательностями.

ЛПС «заякорен» в наружной мембране липидом А, обуславливающим токсичность ЛПС и отождествляемым поэтому с эндотоксином. Разрушение бактерий антибиотиками приводит к освобождению большого количества эндотоксина, что может вызвать у больного эндотоксический шок. От липида А отходит ядро, или стержневая часть ЛПС. O-специфическая цепь, отходящая от стержневой части молекулы ЛПС, обуславливает серогруппу, серовар определенного штамма бактерий. Бактерии с полноценным ЛПС образуют гладкие с блестящей поверхностью колонии, получившие название S-форм (Smooth — гладкий). Генетические изменения могут привести к дефектам, «укорочению» ЛПС бактерий и к появлению в результате этого «шероховатых» колоний R-форм (Rough — шероховатый). Между наружной и цитоплазматической мембраной

находится периплазма, содержащая ферменты (протеазы, липазы, фосфатазы, нуклеазы, бета-лактамазы), а также компоненты транспортных систем. При нарушении синтеза клеточной стенки бактерий под влиянием лизоцима, пенициллина, защитных факторов организма и других соединений образуются клетки с измененной (часто шаровидной) формой: **протопласты** — бактерии, полностью лишенные клеточной стенки; **сферопласты** — бактерии с частично сохранившейся клеточной стенкой. После удаления ингибитора клеточной стенки такие измененные бактерии могут реверсировать, т.е. восстанавливать исходную форму. Бактерии сферо- или протопластного типа, утратившие способность к синтезу пептидогликана под влиянием антибиотиков или других факторов и способные размножаться, называются **L-формами**. L-формы могут возникать и в результате мутаций. Они представляют собой осмотически чувствительные, шаровидные, колбовидные клетки различной величины, в том числе и проходящие через бактериальные фильтры. L-формы могут образовывать многие возбудители инфекционных болезней.

Техника окраски по методу Грама

1. На фиксированный мазок помещают полоску фильтровальной бумаги и добавляют раствор генцианового фиолетового на 2-3 мин
2. Бумагу снимают и наносят раствор Люголя на 1 мин
3. Сливают раствор Люголя, обесцвечивают мазок 96% спиртом в течение 30-40 сек
4. Мазок промывают водой, наносят водный фуксин на 1-2 мин. Промывают еще раз, высушивают и микроскопируют.

Грама (-) бактерии окрашиваются в красный, грама(+) - в темно-фиолетовый цвет. Плохо окрашиваются по методу Грама: *Mycobacterium* (связано с содержанием большого количества липидов в клеточной стенке); *Rickettsia* и *Chlamydia* (очень мелкие по размерам, облигатные внутриклеточные паразиты); *Legionella pneumoniae* (плохо воспринимают раствор фуксина); *Mollicutes* (в связи с отсутствием клеточной стенки- род *Mycoplasma*); *Treponema pallidum* (слабо воспринимают красители).

Цитоплазматическая мембрана собой трехслойную мембрану (два темных слоя толщиной по 2,5 нм каждый разделены светлым — промежуточным). Она состоит из двойного слоя липидов, главным образом фосфолипидов, с поверхностными, интегральными белками, пронизывающими насквозь структуру мембраны. Некоторые из них являются пермеазами, участвующими в транспорте веществ. ЦПМ окружает наружную часть цитоплазмы бактерий и участвует в регуляции осмотического давления, транспорте веществ и энергетическом метаболизме клетки (за счет ферментов цепи переноса электронов, аденозинтрифосфатазы и др.). При избыточном росте (по сравнению с ростом клеточной стенки) ЦПМ образует инвагинаты — впячивания в виде сложно закрученных мембранных структур, называемые мезосомами. Менее сложно закрученные структуры называются внутрицитоплазматическими мембранами. Считают, что они участвуют в делении клетки, обеспечивая энергией синтез клеточной стенки, принимают участие в секреции веществ, спорообразовании, т.е. в процессах с высокой затратой энергии.

Цитоплазма занимает основной объем бактериальной клетки и состоит из растворимых белков, рибонуклеиновых кислот, включений и многочисленных мелких гранул — рибосом, ответственных за синтез (трансляцию) белков.

Рибосомы бактерий имеют размер около 20 нм и коэффициент седиментации 70S. Поэтому некоторые антибиотики, связываясь с рибосомами бактерий, подавляют синтез бактериального белка, не влияя на синтез белка эукариотических клеток. Рибосомы бактерий могут диссоциировать на две субъединицы — 50S и 30S. Рибосомные РНК (рРНК) — консервативные элементы бактерий («молекулярные часы» эволюции). 16S-рРНК входит в состав малой субъединицы рибосом, а 23S-рРНК — в состав большой субъединицы рибосом. В цитоплазме имеются различные включения в виде гранул гликогена, полисахаридов, бета-оксимасляной кислоты и полифосфатов (волютин). Они накапливаются при избытке питательных веществ в окружающей среде и выполняют роль запасных веществ для питания и энергетических потребностей. Волютин обладает сродством к основным красителям и легко выявляется с помощью специальных методов окраски (например, по Нейссеру) в виде метахроматических гранул. Характерное расположение гранул волютина выявляется у дифтерийной палочки в виде интенсивно прокрашивающихся полюсов клетки.

Техника окраски по методу Нейссера

Фиксированный препарат окрашивают ацетатом синьки Нейссера в течение 2-3 мин.

Краситель смывают водой и наносят раствор Люголя на 30 сек - 1 мин.

Смывают раствор Люголя и докрашивают везувином или хризоидином в течение 5-7 мин. Далее мазок промывают водой, высушивают и микроскопируют.

Зерна волютина, имеющие щелочную реакцию окрашиваются ацетатом синьки в темно-синий цвет. Цитоплазма имеющая кислое значение рН воспринимает щелочной везувин и окрашивается в желтый цвет.

Нуклеоид расположен в центральной зоне бактерий в виде двунитевой ДНК, замкнутой в кольцо и плотно уложенной наподобие клубка. Не имеет ядерной оболочки, ядрышка и основных белков (гистонов). Обычно в бактериальной клетке содержится одна хромосома, представленная замкнутой в кольцо молекулой ДНК (у *Borrelia burgdorferi* — линейная ДНК). При нарушении деления в бактерии может находиться 4 и более хромосомы. Нуклеоид выявляется в световом микроскопе после окраски специфическими для ДНК методами: по Фельгену или по Романовскому–Гимзе.

Кроме нуклеоида, в бактериальной клетке имеются внехромосомные факторы наследственности — плазмиды, представляющие собой ковалентно замкнутые кольца ДНК. Плазмиды придают бактериям дополнительные свойства: устойчивость к антибиотикам (R-плазмиды), способность к передаче генетического материала при конъюгации (F-плазмиды), продукция бактериоцинов, в частности колицинов, подавляющих рост других бактерий (Col-плазмиды), и другие свойства.

Капсула — слизистая структура толщиной более 0,2 мкм, прочно связанная с клеточной стенкой бактерий и имеющая четко очерченные внешние границы. Капсула состоит из полисахаридов (экзополисахаридов), иногда из полипептидов; например, у сибиреязвенной бациллы она состоит из полимеров D-глутаминовой кислоты. Капсула гидрофильна, включает большое количество воды. Она препятствует фагоцитозу бактерий. Капсула выявляется при специальных методах окраски мазка по Бурри—Гинсу, создающих негативное контрастирование веществ капсулы: тушь создает темный фон вокруг капсулы. Многие бактерии образуют микрокапсулу — слизистое образование толщиной менее 0,2 мкм, выявляемое лишь при электронной микроскопии. От капсулы следует отличать слизь — растворимые в воде мукоидные экзополисахариды, не имеющие четких внешних границ. Экзополисахариды участвуют в адгезии (прилипанию к субстратам); их еще называют

гликокаликсом. Капсула и слизь предохраняют бактерии от повреждений, высыхания, так как, будучи гидрофильными, хорошо связывают воду, препятствуют действию защитных факторов макроорганизма и бактериофагов.

Выявление капсулы по методу Бурри-Гинса.

На предметное стекло наносят каплю черной туши с которой смешивают культуру бактерий, и затем распределяют при помощи второго предметного стекла, которое держат под углом 45°.

Мазок высушивают и фиксируют физико-химическим методом

Наносят карболовый фуксин Циля на 3-5 мин, промывают и микроскопируют

В препарате видны бактерии красного цвета, вокруг которых контрастно выделяются неокрашенные капсулы на черном фоне

Жгутики бактерий определяют подвижность бактериальной клетки. Они представляют собой тонкие нити, берущие начало от цитоплазматической мембраны, имеют большую длину, чем сама. Толщина жгутиков 12–20 нм, длина 3–15 мкм. Они состоят из трех частей: спиралевидной нити, крюка и базального тельца, содержащего стержень со специальными дисками (одна пара дисков — у грамположительных и две пары — у грамотрицательных бактерий). Дисками жгутики прикреплены к цитоплазматической мембране и клеточной стенке. В качестве источника энергии используется разность протонных потенциалов на цитоплазматической мембране. Механизм вращения обеспечивает протонная АТФ-синтетаза.

Жгутики состоят из белка флагеллина (от. *flagellum* — жгутик), являющегося антигеном, — так называемый Н-антиген. Субъединицы флагеллина закручены в виде спирали. Число жгутиков у бактерий различных видов варьирует от одного (*монотрих*) у холерного вибриона до десятка и сотен жгутиков, отходящих по периметру бактерии (*перитрих*), у кишечной палочки, протей и др. *Лофотрихи* имеют пучок жгутиков на одном из концов клетки. *Амфитрихи* — по одному жгутику или пучку жгутиков на противоположных концах клетки. Жгутики выявляют с помощью электронной микроскопии препаратов, напыленных тяжелыми металлами, или в световом микроскопе после обработки специальными методами, основанными на протравливании и адсорбции различных веществ, приводящих к увеличению толщины жгутиков (например, после серебрения).

Изучение подвижности бактерий.

Прямой метод “феномен роения”

Метод Шукевича - применяется для получения чистой культуры протей и других микроорганизмов обладающих «ползущим» ростом.

Препараты “раздавленная и висячая” капля

Витальная окраска

Метод Леффлёра –протравливание смесью растворов фуксина, танина и раствора сернокислого Fe и докрашивание карболовым фуксином

Препарат «раздавленная» капля готовят для изучения подвижности

На середину предметного стекла наносят каплю исследуемого материала и накрывают покровным стеклом. Приготовленные препараты рассматривают в затемненном поле зрения светового микроскопа

Препарат «висячая» капля. Небольшую каплю исследуемого материала наносят на покровное стекло. Предметным стеклом с лункой покрывают покровное стекло и быстро переворачивают препарат покровным стеклом вверх. В этом случае капля свободно свисает не касаясь дна и краев лунки

Витальное окрашивание используется для изучения живых бактерий, размножения микроорганизмов, спорообразования, влияния физических и химических факторов. Используют 10000, 100000-ые разведения растворов метиленового синего и нейтрального красного.

Пили (фимбрии, ворсинки) — нитевидные образования. Пили отходят от поверхности клетки и состоят из белка пилина. Различают пили, ответственные за адгезию, т.е. за прикрепление бактерий к поражаемой клетке, а также пили, ответственные за питание, водносолевой обмен, и половые (F-пили), или конъюгационные, пили. Одни из самых тонких пилей (толщина 1–2 нм), называемые «кудряшками», способны сваливаться, агрегируя клетки. Они участвуют в адгезии, коагрегации, формировании биологической пленки и, что показано для гибких пилей IV типа, в движении клетки. Пили многочисленны — несколько сотен на клетку. Однако половых пилей обычно бывает 1–3 на клетку: они образуются так называемыми мужскими клетками-донорами, содержащими трансмиссивные плазмиды (F-, R-, Col-плазмиды). Их отличительной особенностью является взаимодействие с особыми «мужскими» сферическими бактериофагами, которые интенсивно адсорбируются на половых пиллях.

Споры — своеобразная форма покоящихся грамположительных бактерий. Споры образуются при неблагоприятных условиях существования бактерий (высушивание, УФ-облучение, дефицит питательных веществ и др.). Внутри бактериальной клетки образуется одна спора (эндоспора). Образование спор способствует сохранению вида и не является способом размножения, как у грибов. Спорообразующие бактерии рода *Bacillus*, у которых размер споры не превышает диаметр клетки, называются бациллами. Спорообразующие бактерии, у которых размер споры превышает диаметр клетки, отчего они принимают форму веретена, называются клостридиями, например бактерии рода *Clostridium* (от лат. *clostridium* — веретено). Споры кислотоустойчивы, поэтому окрашиваются по методу Ауески или по методу Циля—Нельсена в красный, а вегетативная клетка — в синий. Форма спор может быть овальной, шаровидной; расположение в клетке — терминальное, т.е. на конце палочки (у возбудителя столбняка), субтерминальное — ближе к концу палочки (у возбудителей ботулизма, газовой гангрены) и центральное (у сибиреязвенной бациллы). Процесс спорообразования (споруляция) проходит ряд стадий, в течение которых часть цитоплазмы и хромосома бактериальной вегетативной клетки отделяются, окружаясь растущей цитоплазматической мембраной, — образуется проспора, окруженная цитоплазматическими мембранами, между которыми формируется толстый измененный пептидогликановый слой кортекса (коры). Изнутри он соприкасается с клеточной стенкой споры, а снаружи — с внутренней оболочкой споры. Наружная оболочка споры образована вегетативной клеткой.

Споры некоторых бактерий имеют дополнительный покров — экзоспориум. Спора обладает термоустойчивостью, которую связывают с наличием в ней дипиколината кальция. Спора долго может сохраняться из-за наличия многослойной оболочки, дипиколината кальция, низкого содержания воды и вялых процессов метаболизма. В почве, например споры возбудителей сибирской язвы и столбняка, могут сохраняться десятки лет.

В благоприятных условиях споры прорастают, проходя три последовательные стадии: активацию, инициацию, вырастание. При этом из одной споры образуется одна бактерия.

Методика окраски споры по методу Ожешко

На высушенный, не фиксированный мазок наливают 0,5% р-р HCL и подогревают над пламенем горелки до появления паров (2-3мин).

Остатки кислоты сливают, мазок после охлаждения промывают водой, высушивают, фиксируют в пламени горелки

Далее препарат окрашивается по методу Циля-Нильсена. Споры окрашиваются в красный цвет, вегетативные клетки - в синий.

Карболовая кислота смягчает оболочку споры и повышает ее тинкториальные свойства, и обе формы окрашиваются в красный цвет. Вегетативные формы обесцвечиваются серной кислотой, и окрашиваются метиленовым синим.