

Тема: Морфология и ультраструктура бактериальных клеток.

Простые и сложные методы окраски

Основные морфологические группы бактерий

Морфология бактерий - размер, форма и взаимное расположение бактериальных клеток.

Формы бактерий

Всем бактериям присуща определенная форма и размеры, которые выражаются в **микрометрах (мкм)**.

Различают следующие основные **формы бактерий**:

- 1.шаровидные** (сферические), или кокковидные;
- 2.палочковидные** (цилиндрические);
- 3.извитые** (спиралевидные);
- 4.нитевидные.**

Кокковидные патогенные бактерии обычно имеют форму **правильного шара** диаметром 1,0— 1,5 мкм; некоторые — **бобовидную, ланцетовидную, эллипсоидную форму**. По характеру **взаиморасположения** образующихся после деления клеток кокки подразделяют на следующие группы:

1. Микрококки. Делятся в одной плоскости, располагаются одиночно и беспорядочно; сапрофиты; патогенных для человека нет

2. Диплококки (от *лат*— двойной). Деление происходит в одной плоскости с образованием пар клеток, имеющих либо бобовидную либо ланцетовидную (гонококки, пневмококки)

3. Стрептококки (от *греч*— цепочка). Деление клеток происходит в одной плоскости, но размножающаяся клетки сохраняют между собой связь и образуют различной длины цепочки, напоминающие нити бус.

4. Стафилококки (от *лат.* гроздь винограда). Деление происходит в нескольких плоскостях, а образующиеся клетки располагаются скоплениями, напоминающими **гроздь винограда**.

5. Тетракокки (от *лат* - четыре). Деление клеток происходит в двух взаимно перпендикулярных плоскостях с образованием тетрад.

6. Сарцины (от *лат*— связка, тук). деление клеток происходит в трех взаимно перпендикулярных плоскостях с образованием пакетов (тюков) из 8, 16, 32 и большего числа особей. Особенно часто

Палочковидные (цилиндрические) формы бактерий.

Палочки бывают **длинными** — более 3 мкм, **короткими** — 1,5—3,0 мкм и **очень короткими** — менее 1,0 мкм — в виде коккобактерий.

- **Концы палочек могут быть закругленными, заостренными, утолщенными, обрезанными**
- Палочка может иметь овоидную (яйцевидную) форму.
- **По диаметру их делят на тонкие и толстые.**

- По взаиморасположению бактерий их подразделяют на три группы:
 - **1) монобактерии** — палочки располагаются одиночно и беспорядочно, сюда относится большинство палочковидных форм
 - **2) диплобактерии**, располагающиеся попарно
 - **3) стрептобактерии**— бактерии, располагающиеся цепочкой.
-
- Бактерии – споронеобразующие палочки
 - Бациллы – спорообразующие палочки
 - Клостридии - спорообразующие палочки, спора деформирует клетку («веретено»)

- **Извитые (спиралевидные) бактерии** по количеству и характеру завитков, а также по диаметру клеток подразделяют на две группы:
- **1) вибрионы** (от *греч.* — извиваюсь, изгибаюсь) имеют **один изгиб**, не превышающий четверти оборота спирали, однако могут иметь и форму прямой палочки, **без изгиба**
- **2) спириллы** (от *греч.* — завиток) — клетки, имеющие большой диаметр и **малое (2-3) число завитков**.
- **3) Особую группу спиралевидных бактерий представляют спирохеты**

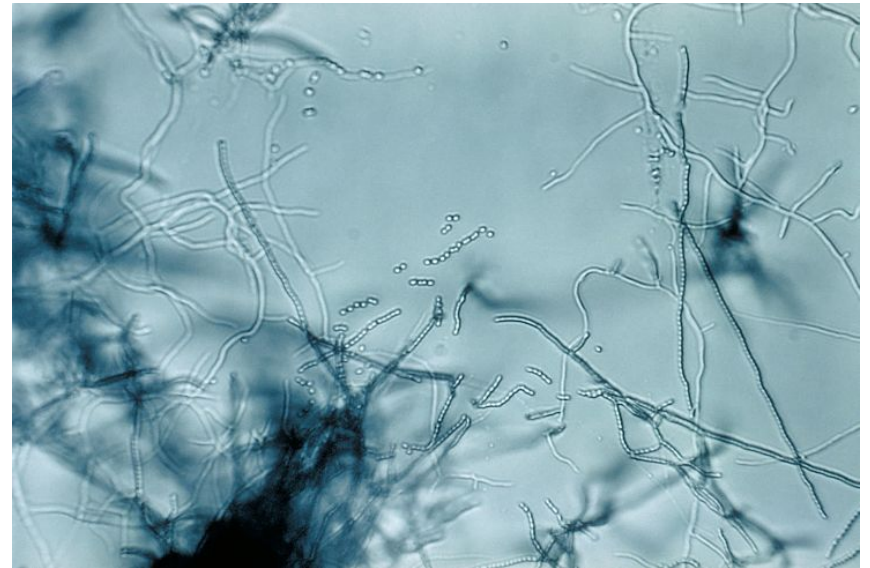
- **Нитевидные формы бактерий.** Различают два типа нитевидных бактерий: образующие **временные нити** и **постоянные**.
- **Временные нити**, иногда с ветвлениями, образуют палочковидные бактерии при нарушении условий их роста или регуляции клеточного деления (микобактерии, коринебактерии, а также риккетсии, микоплазмы, многие грамотрицательные и грамположительные бактерии). При восстановлении механизма регуляции деления и нормальных условий роста эти бактерии восстанавливают обычные для них размеры.
- **Постоянные нитевидные формы** образуются из палочковидных клеток, соединяющихся в длинные цепочки либо с помощью слизи, либо чехлами, либо мостиками.

ТОНКОСТЕННЫЕ, ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ		ТОЛСТОСТЕННЫЕ, ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ	
Менингококки		Пневмококки	
Гонококки		Стрептококки	
Вейлонеллы		Стафилококки	
Палочки		Палочки	
Вибрионы		Бациллы*	
Кампилобактерии, Хеликобактерии		Клостридии*	
Спириллы		Коринебактерии	
Спирохеты		Микобактерии	
Риккетсии		Бифидобактерии	
Хламидии		Актиномицеты	

Расположение спор: 1 – центральное, 2 – субтерминальное, 3 – терминальное.



сарцины



актиномицеты

Этапы приготовления мазков-препаратов.

- 1. Подготовка стекла:** исследуемый материал наносят на чистое обезжиренное смесью Никифорова предметное стекло (смесь Никифорова - смесь равных объемов 96% этилового спирта и эфира)
- 2. Приготовление мазка:**
- 3. Высушивание мазков** производится на воздухе при комнатной температуре или в токе теплого воздуха (высоко над пламенем горелки). Нельзя допускать закипания материала на предметном стекле, т.к. при этом может нарушиться структура микроорганизмов.
- 3. Фиксация препарата:** высушенные мазки подвергают термической (предметное стекло мазком вверх проводят несколько раз через пламя горелки) или химической (фиксирующие растворы: формалин, спирты, глутаральдегид, жидкость Карнау (6 ч. этил. спирта, 3 ч. хлороформа и 1 ч. ледяной уксусной к-ты) ацетон, пары осмиевой кислоты) обработке, в результате которой бактерии погибают и плотно прикрепляются к поверхности стекла.
- 4. Окраска мазков.**

Гинкториальные свойства - свойства бактерии, грибов и простейших, характеризующие их способность вступать в реакцию с красителями (воспринимать и удерживать краситель) и окрашиваться определенным образом.

Окраска мазков производится простыми или сложными методами.

1. **Простые** - один краситель, по результатам окраски можем судить о форме клеток, их взаиморасположении.

2. **Сложные** несколько последовательно наносимых красителей (основной краситель; дифференцирующее вещество; дополнительный краситель) и дополнительные способы обработки. По результатам окраски судят об ультраструктурных компонентах клетки.

Структурные компоненты бактериальной клетки:

1. Поверхностные структуры:

- капсула
- клеточная стенка
- ЦПМ
- жгутики, ворсинки

2. Внутренние структуры, входящие в протопласт:

- нуклеоид,
- рибосомы,
- мезосомы,
- споры,
- включения,
- плазмиды и др. внехромосомные генетические структуры

1. Постоянные структуры:

- клеточная стенка,
- ЦПМ,
- нуклеоид, рибосомы, мезосомы

2. Непостоянные структуры:

- ворсинки, жгутики, капсула, споры, включения, плазмиды и др.

внехромосомные генетические структуры

Функции облигатных и факультативных компонентов бактериальной клетки

Клеточная стенка — структурный компонент, присущий только бактериям (кроме микоплазм).

Клеточная стенка выполняет следующие функции:

1. Определяет и сохраняет постоянную форму клетки (структурная функция).
2. Защищает внутреннюю часть клетки от действия механических и осмотических сил внешней среды (защитная функция).
3. Участвует в регуляции роста и деления клеток.
4. Обеспечивает коммуникации с внешней средой через каналы и поры (транспортная функция).
5. Несет на себе специфические рецепторы для бактериофагов.
6. Определяет во многом антигенную характеристику бактерий (природу и специфичность О- и К-антигенов).
7. Содержащийся в ее составе пептидогликан наделяет клетку важными иммунобиологическими свойствами (см. ниже).
8. Нарушение синтеза клеточной стенки бактерий является

Строение клеточной стенки

- В составе клеточной стенки имеется два слоя: наружный — пластичный и внутренний — ригидный.
- Основу клеточной стенки составляет пептидогликан, который ранее называли муреином (от *лат* — стенка).

Пептидогликан обладает следующими важнейшими иммунобиологическими свойствами:

1. В его составе обнаружены родоспецифические **антигенные детерминанты**.
2. Пептидогликан запускает классический и альтернативный пути активации системы **комплемента**.
3. Он **тормозит фагоцитарную активность** макрофагов, т.е. защищает бактерии, особенно грамположительные, от фагоцитоза.
4. Угнетает миграцию макрофагов.
5. Способен индуцировать развитие гиперчувствительности замедленного действия.
6. Обладает противоопухолевым действием.
7. Оказывает **пирогенное действие** на организм человека и животных.

Все бактерии, в зависимости от их отношения к окраске по Граму, делятся на грамположительные и грамотрицательные.

Особенности клеточной стенки грамположительных бактерий

Основную массу стенки составляет **пептидогликан**. Он представлен не 1-2 слоями, как у грамотрицательных бактерий, а 5-6, на его долю приходится до 90% сухой массы клеточной стенки. Клеточная стенка **содержит много тейхоевых кислот** (до 50% сухого веса ее). **Тейхоевые кислоты — главные поверхностные антигены многих грамположительных бактерий**. Они в значительном количестве располагаются между цитоплазматической мембраной и слоем пептидогликана, и через поры в нем выступают наружу.

Клеточная стенка большинства грамположительных бактерий **не содержит липидов**

*Особенность пептидогликанов грамположительных бактерий — частое **отсутствие в них диаминопимелиновой кислоты**.* В

клеточной стенке грамположительных бактерий **отсутствуют липополисахариды**; содержание белка в них сильно варьирует. Белки во многом определяют антигенную специфичность таких бактерий. Например, стрептококки серогруппы А по белкам М и Т подразделяют на несколько десятков серотипов.

Особенности клеточной стенки граммотрицательных бактерий

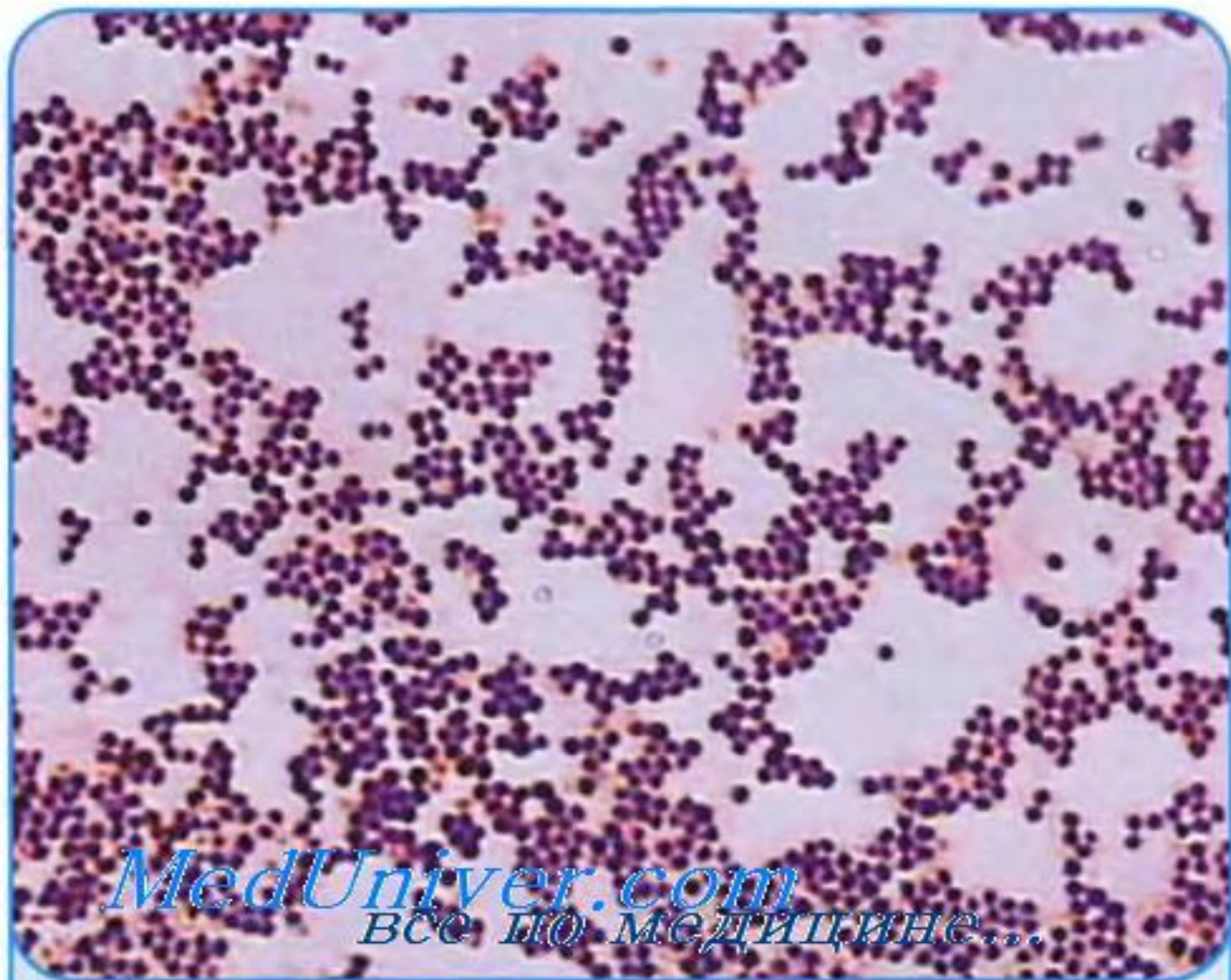
Основная особенность клеточной стенки грамотрицательных бактерий: ригидный слой тонкий, представлен **одним** или, редко, двумя **слоями пептидогликана**, на долю которого приходится до 5—10% сухого веса стенки. Для пептидогликана характерно низкое содержание поперечных сшивок между пептидными цепочками, однако в нем почти всегда имеется **диаминопимелиновая кислота**.

В составе клеточной стенки содержится много липопротеинов, фосфолипидов, липополисахарид, больше белка и, как правило, отсутствуют тейхоевые кислоты.

Пластичный слой клеточной стенки у грамотрицательных бактерий представляет сложную мозаику, образованную из липопротеинов, липополисахаридов и наружной мембраны.

• Принцип метода окраски по Граму:

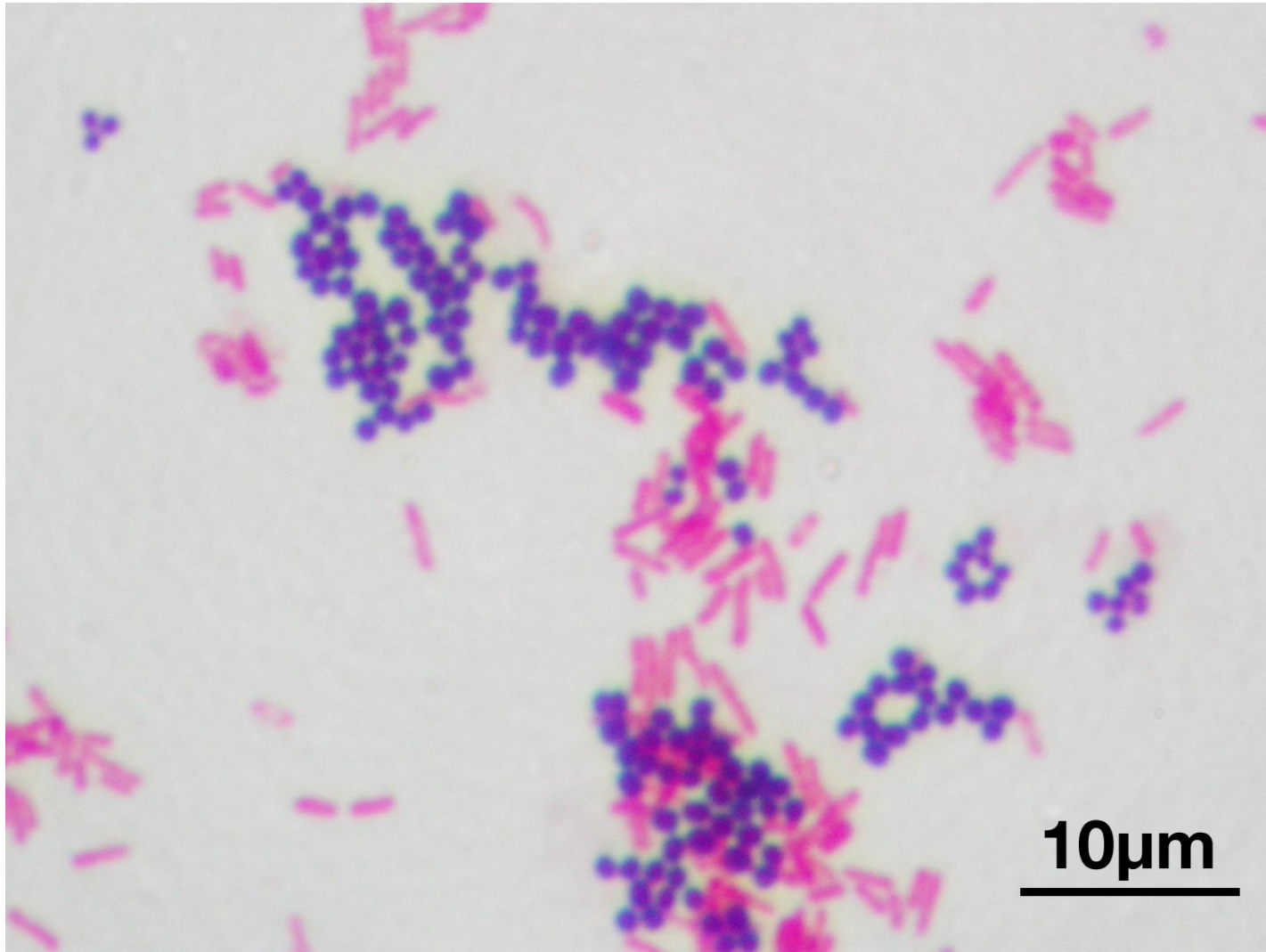
- Генцианвиолет связывается с пептидогликаном клеточной стенки. Толстый слой пептидогликана грамположительных бактерий связывает много красителя, тонкий слой - грамотрицательных - мало.
- Раствор Люголя фиксирует краситель за счет образования комплекса краситель-пептидогликан-йод.
- При обработке мазка спиртом грамотрицательные микроорганизмы быстро теряют краситель и обесцвечиваются, а грамположительные - остаются окрашенными в синий цвет.
- Дополнительный краситель (фуксин) окрашивает грамотрицательные микроорганизмы в красный цвет.



MedUniver.com
ВСЕ ПО МЕДИЦИНЕ...

Рис. 3.17. Мазок чистой культуры *S. aureus*. Окраска по Граму

Смесь Грам+ и Грам- бактерий



Цитоплазматическая мембрана: строение

(клеточная мембрана, или цитолемма, или плазмолемма)

ЦПМ содержит 25—40% **фосфолипидов, образующих два слоя**, 20—75% белков и до 6% углеводов.

Молекулы **фосфолипидов асимметричны**: головки, несущие электрический заряд, гидрофильны; хвосты — нейтральны и гидрофобны.

Фосфолипиды упакованы в мембране следующим образом: их полярные гидрофильные головки обращены наружу и образуют два слоя ЦПМ — внутренний и внешний, а неполярные гидрофобные хвосты скрыты в толще мембраны. На электронограммах ЦПМ имеет вид трехслойной структуры, состоящей из двух 2 параллельных темных слоев и разделяющего их светлого слоя.

Функции цитоплазматической мембраны

- **барьерная** — обеспечивает регулируемый, избирательный, пассивный и активный обмен веществ с окружающей средой.
- **транспортная** — через мембрану происходит транспорт веществ в клетку и из клетки.
- **энергетическая** — при фотосинтезе в хлоропластах и клеточном дыхании в митохондриях в их мембранах действуют системы переноса энергии;
- **рецепторная** — некоторые белки, находящиеся в мембране, являются рецепторами
- **ферментативная** — мембранные белки нередко являются ферментами.
- **маркировка клетки** — на мембране есть антигены, действующие как маркеры — «ярлыки», позволяющие опознать клетку.

• **Нуклеоид** — эквивалент ядра. Здесь находится генетический материал (хранение наследственной информации) Расположен в центральной зоне бактерий в виде двунитевой ДНК (одна хромосома), замкнутой в кольцо и плотно уложенной в клубок. Не имеет ядерной оболочки.

Нуклеоид выявляется при электронной микроскопии или 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** (ковалентно замкнутые кольца ДНК).

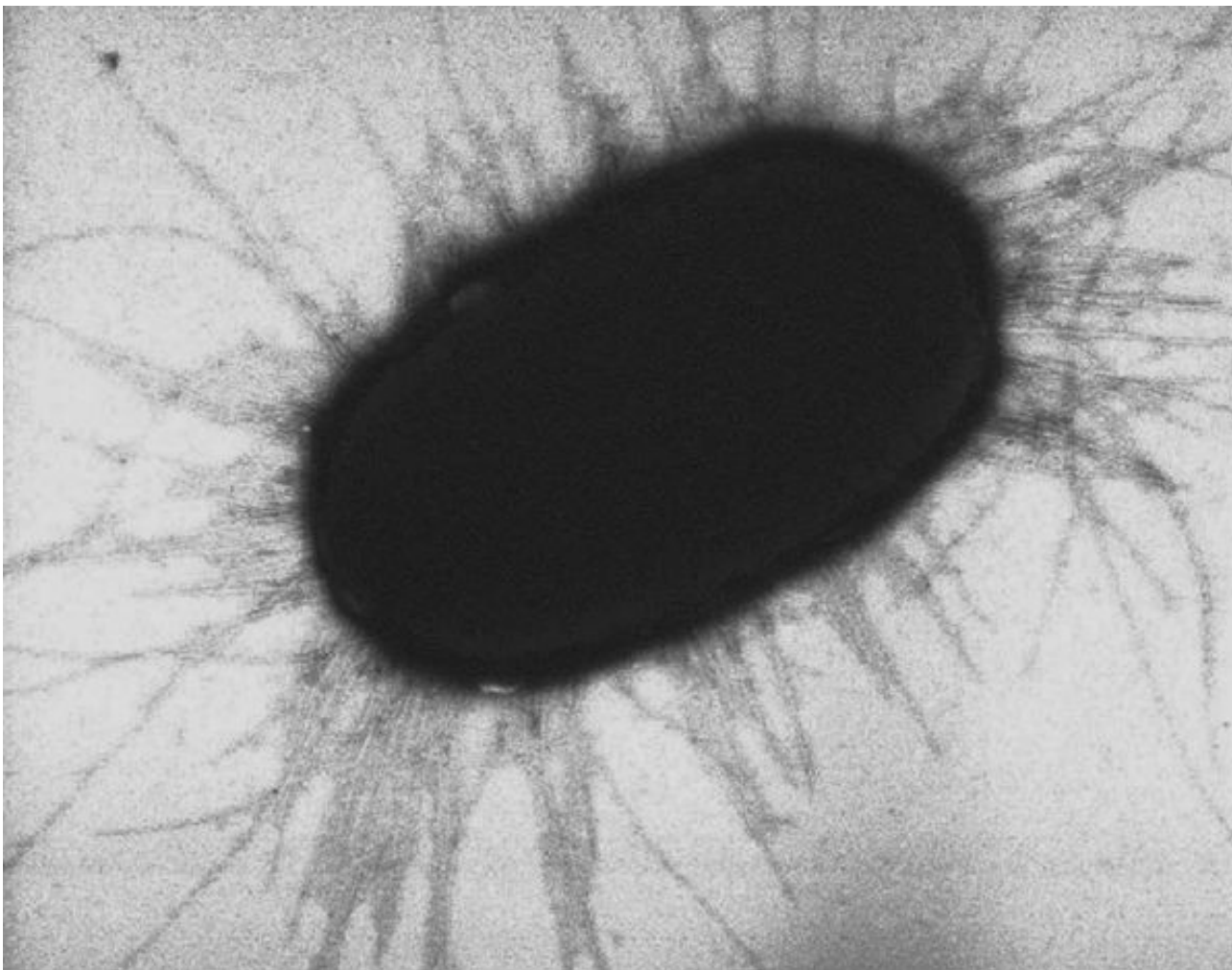
- **Цитоплазма** занимает основной объем бактериальной клетки и состоит из растворимых белков, рибонуклеиновых кислот, включений и многочисленных мелких гранул диаметром 15-20 нм—рибосом.
- **Рибосомы** - органоиды, осуществляющие биосинтез белка из аминокислот по заданной матрице на основе генетической информации. Они состоят из белка и РНК.

МЕЗОСОМЫ

Внутрицитоплазматические мембранные структуры бактерий везикулярной и трубчатой формы, образующиеся путём впячивания ЦПМ внутрь цитоплазмы. Предполагается, что мезосомы участвуют в образовании клеточных перегородок, к ним прикрепляется ДНК нуклеоидов.

- **Ворсинки, или пили (фимбрии)** — нитевидные образования, более **тонкие и короткие, чем жгутики**.
- Пили отходят от поверхности клетки и состоят из **белка пилина**.
- Функции пилей разного типа до конца не установлены. Различают пили:
 1. **Ответственные за адгезию**, т. е. за прикрепление бактерий к поражаемой клетке.
 2. **Ответственные за питание, водно-солевой обмен**.
 3. **Половые или конъюгационные пили (F-пили)**.

Пили, E.coli (эл.микроскопия)



Жгутики бактерий определяют подвижность бактериальной клетки. Жгутики представляют собой тонкие нити, берущие начало от цитоплазматической мембраны, имеют **большую длину, чем сама клетка**. Толщина жгутиков 12-20 нм, длина 3—15 мкм.

• **Они состоят из 3 частей:**

- 1. - спиралевидной нити,
 - 2. - крюка
 - 3. - базального тельца, содержащего стержень со специальными дисками (1 пара дисков — у грамположительных и 2 пары — у грамотрицательных бактерий).
- 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** имеют по одному жгутику или пучку жгутиков на противоположных концах клетки.
- Жгутики выявляют с помощью электронной микроскопии препаратов.

Капсула, микрокапсула, слизь.

Капсула — слизистая структура толщиной более 0,2 мкм, прочно связанная с клеточной стенкой бактерий и имеющая четко очерченные внешние границы.

Капсула различима в мазках-отпечатках из патологического материала.

микрокапсула — слизистое образование толщиной менее 0,2 мкм, выявляемое лишь при электронной микроскопии

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

- **Споры** — своеобразная форма покоящихся бактерий с грамположительным типом строения клеточной стенки.
- **Споры образуются при неблагоприятных условиях существования бактерий (высушивание, 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.**
- **Споры кислотоустойчивы, поэтому окрашиваются по методу Ожешко, 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)**
- **центральное (у сибиреязвенной бациллы).**

- 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. Толуидиновым синим или метиленовым голубым волютин окрашивается в красно-фиолетовый цвет, а цитоплазма бактерии — в синий. Характерное расположение гранул волютина выявляется у дифтерийной палочки в виде интенсивно прокрашивающихся полюсов клетки.
- При электронной микроскопии зерна волютина имеют вид электронно-плотных гранул размером 0,1—1,0 мкм.

СЛОЖНЫЕ МЕТОДЫ

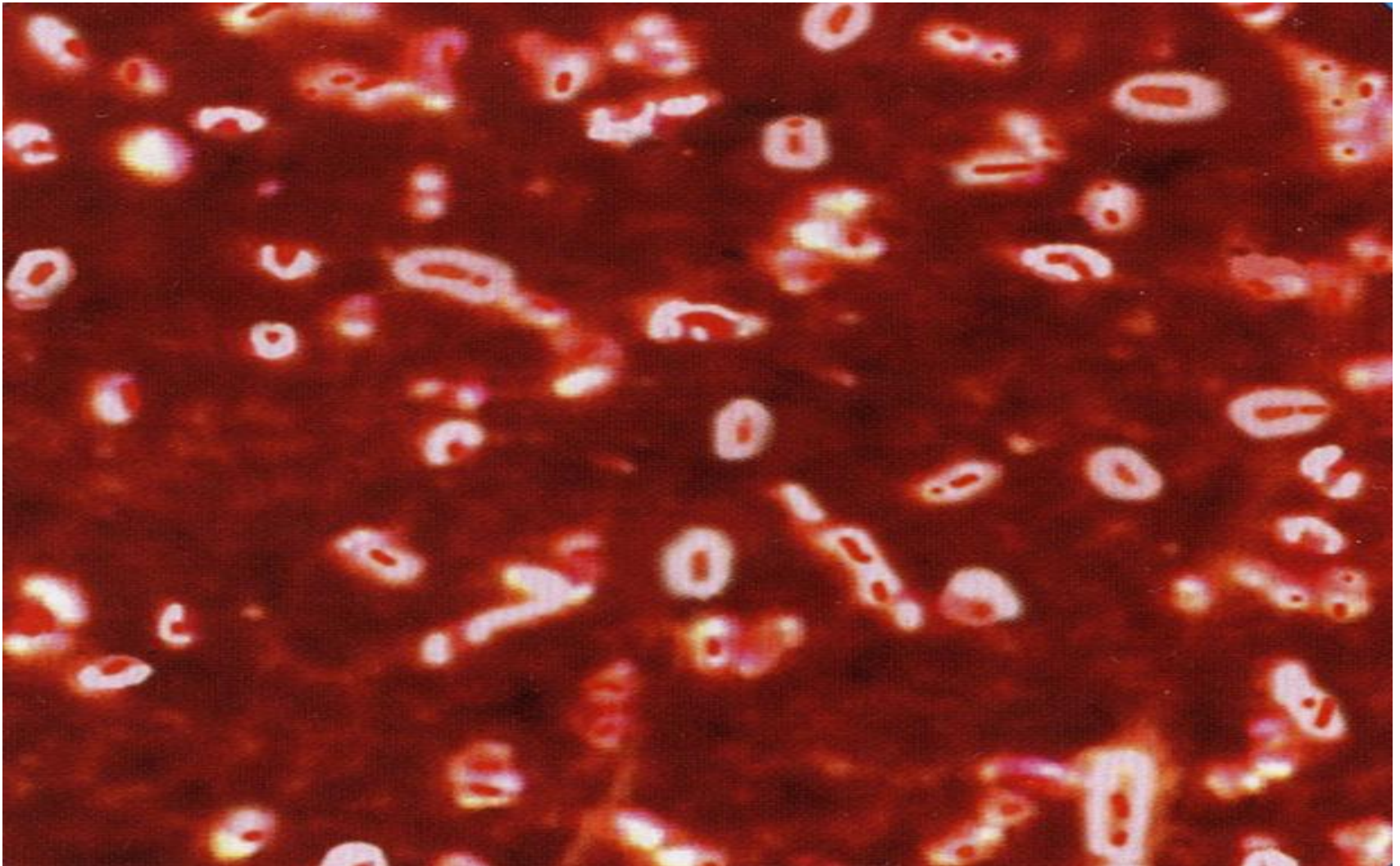
ОКРАСКИ

ВЫЯВЛЕНИЕ КАПСУЛ ПО БУРРИ И БУРРИ-ГИНСУ.

На середину предметного стекла наносят каплю черной туши и смешивают ее с помощью петли с каплей культуры капсульных бактерий.

- Мазок сушат на воздухе и фиксируют в пламени горелки.
- Окрашивают 5 мин карболовым фуксином, разведенным водой 1:3.
- Осторожно промывают водой, высушивают.
- Бактерии окрашиваются в красный цвет, неокрашенные капсулы контрастно выделяются на темном фоне препарата.

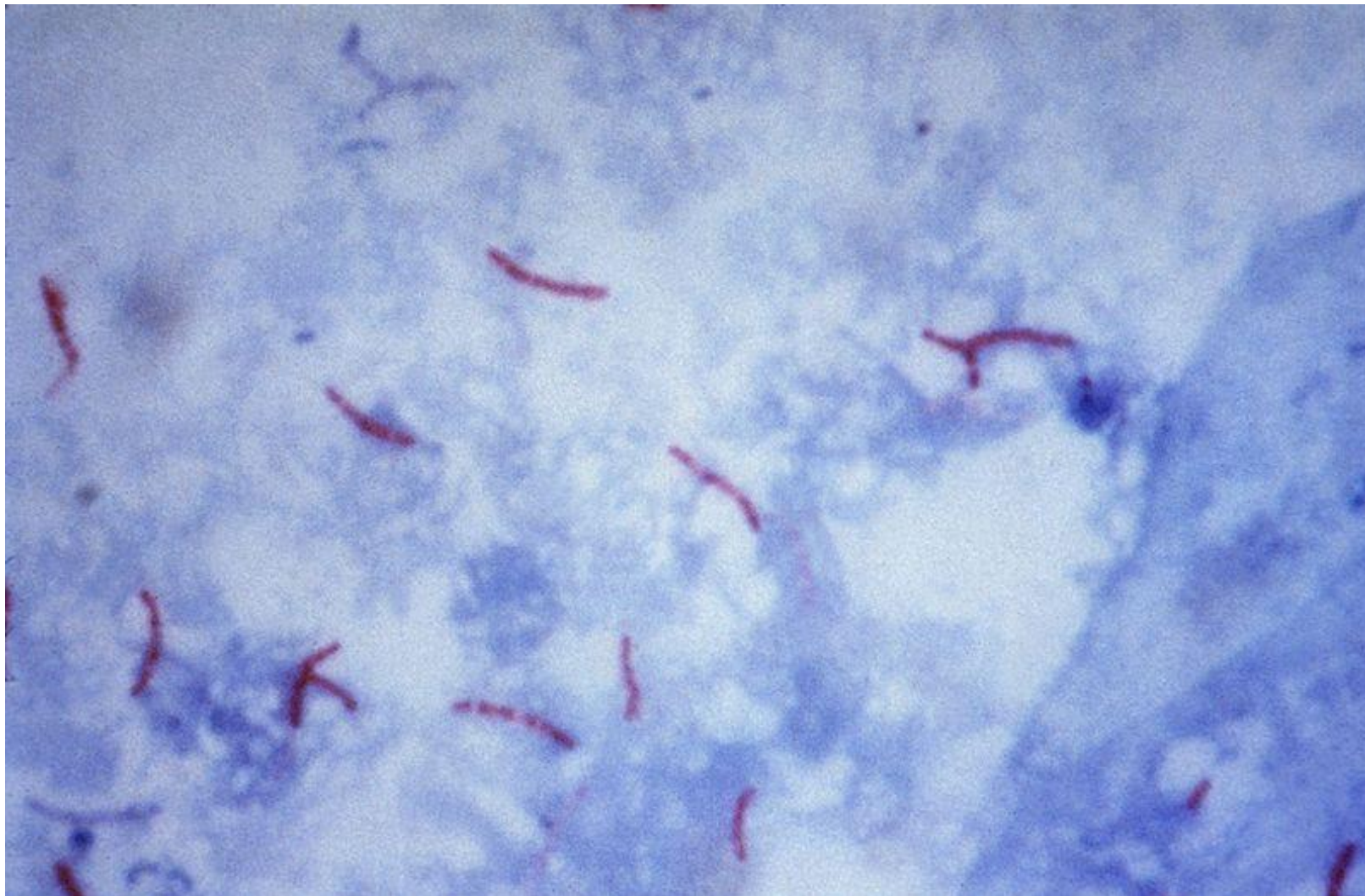
Мазок из чистой культуры *Klebsiella pneumoniae*, окраска по Бурри-Гинсу. Видны капсулы — светлые ореолы вокруг палочковидных бактерий



кислотоустойчивости)

1. На фиксированный мазок наносят карболовый р-р фуксина через полоску фильтровальной бумаги и подогревают до появления паров в течение 3-5 мин
 2. Снимают бумагу, промывают мазок водой
 3. Наносят 5% р-р серной кислоты или 3% р-р смеси спирта с соляной кислотой на 1-2 мин для обесцвечивания. Промывают водой
 4. Докрашивают мазок водным р-ром метиленового синего в течение 3-5 мин
 5. Промывают водой, высушивают и микроскопируют
- * Неислотоустойчивые микроорганизмы – обесцвечиваются и затем окрашиваются метиленовым синим в голубой цвет, а кислотоустойчивые остаются окрашенными фуксином в красный.

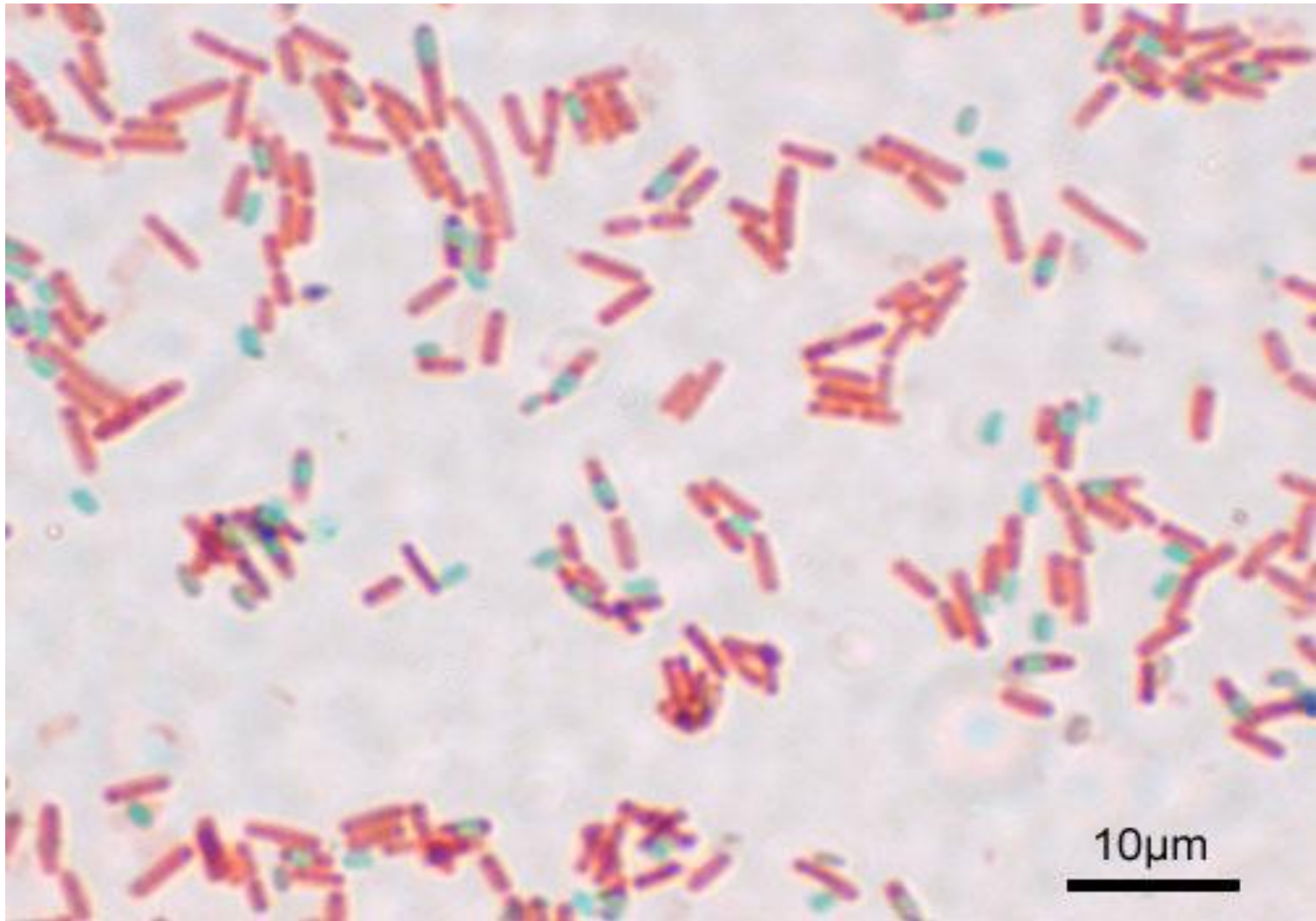
Mycobacterium tuberculosis, окраска по Цилю — Нельсену



ОКРАСКА СПОР ПО ОЖЕШКО

- нанести несколько капель 0,5% соляной кислоты на нефиксированный мазок и нагреть до появления паров (2-3 минуты);
- слить кислоту, промыть водой, высушить;
- зафиксировать в пламени;
- окрасить по методу Циля-Нильсена (при этом споры окрашиваются в красный цвет, а вегетативные формы – в синий). Часто для окраски спор используют только метод Циля-Нильсена.

Окрашенный препарат *Bacillus subtilis*. Вегетативные клетки выделены красным, споры — зелёным.



ОКРАСКА ВОЛЮТИНА ПО НЕЙССЕРУ

- Окрасить мазок уксуснокислой синькой Нейссера (2-3 минуты);
- Промыть;
- Окрасить раствором Люголя (30 секунд);
- Слить раствор Люголя и окрасить везувином (1 минута)
- Промыть препарат и высушить
- Цитоплазма клетки, имеющая кислую реакцию, принимает желтый цвет. Зерна волютина – темно-синие, почти черные.

Рисунок мазка из чистой культуры C diphtheriae. Окраска по Нейссеру



- Бактериоскопический (микроскопический) метод - совокупность способов обнаружения и изучения морфологических и тинкториальных свойств бактерий (микробов) в лабораторной культуре, патологическом материале или в пробах из внешней среды с помощью микроскопа. Применяют для установления диагноза инфекционного заболевания или иного вызванного микробами процесса, а также при идентификации выделенной чистой культуры.