

МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

Лекция 2

Морфология и ультраструктура бактерий

Прокариоты и эукариоты

- «Истинные» бактерии (которые включают все патогенные для человека бактерии) входят в одно царство – *Eubacteria* (или домен *Bacteria* по новой классификации). Эубактерии также широко распространены в окружающей среде
- Вторая группа бактерий окружающей среды составляет второе царство *Archebacteria* (или второй домен - *Archea* по новой классификации). Эти бактерии не патогенны для человека

Прокариоты и эукариоты

- **Морфологически представители этих двух царств сходны и поэтому вместе составляют надцарство Procaruotaе. Однако они имеют существенные молекулярные и биохимические отличия**
- **Все другие клеточные формы жизни (включая растения, животных, человека и грибы) относятся к надцарству Eucarya - Эукариотам**

Принципиальные отличия организации и функционирования клеток прокариот

Прокариоты:

- **Отсутствие мембран, с помощью которых органеллы микробной клетки (например, ядро) отграничены от цитоплазмы – отсутствие подразделения клеток на отсеки (компарментализация).**
- **Имеется только цитоплазматическая мембрана, отделяющая цитоплазму от клеточной оболочки или непосредственно от внешней среды.**

Принципиальные отличия организации и функционирования клеток прокариот

Прокариоты:

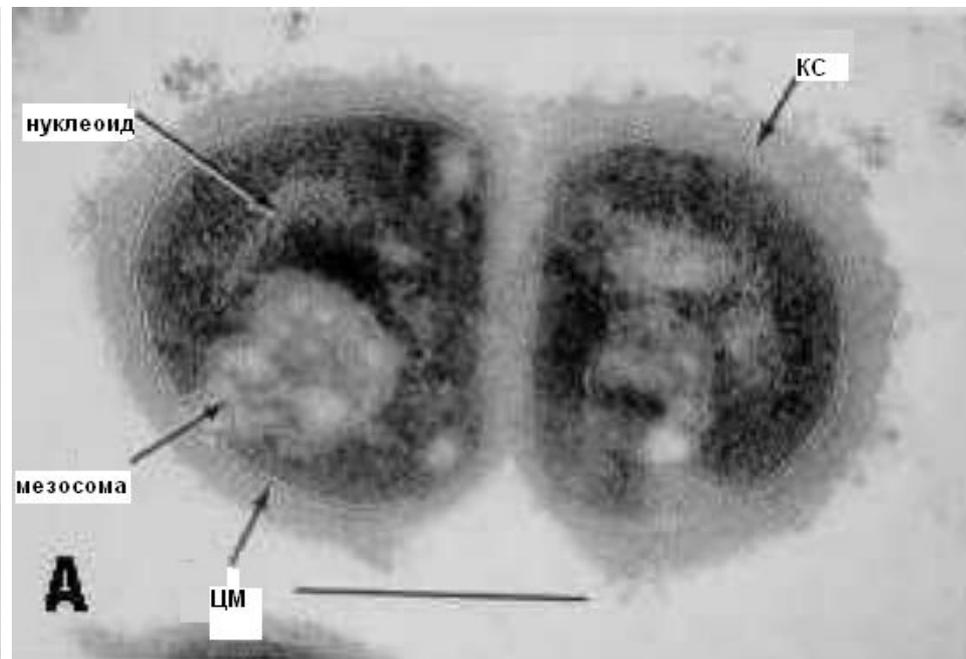
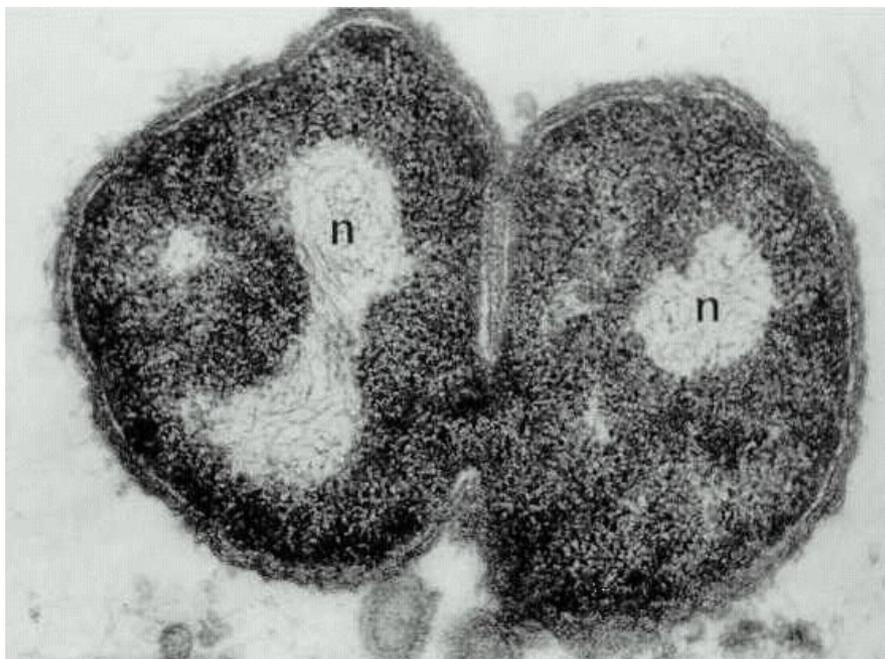
- **Бактериальные рибосомы 70S, субъединицы – 30S (16SPHK) и 50S (23SPHK и 5SPHK) (S–единица размера Swedberg).**
- **Рибосомы эукариот больше - 80S**
- **У прокариот отсутствуют митохондрии, окислительно-восстановительные ферменты локализованы в производных образованиях цитоплазматической мембраны - мезосомах.**
- **Рибосомы митохондрий эукариот также, как и бактериальные рибосомы, имеют размер 70S, считают, что митохондрии эукариот ранее были свободно живущими бактериями, поглощенными затем эукариотическими клетками**

Принципиальные отличия организации и функционирования клеток прокариот

Прокариоты:

- Ядро у прокариот, которое часто называют *нуклеоидом*, имеет фибриальную структуру и не отграничено от цитоплазмы ядерной мембраной. Поскольку отсутствует ядерная мембрана, нуклеоид связан со специфическим сайтом цитоплазматической мембраны - *мезосомой*
- В клетках прокариот отсутствуют также пластинчатый комплекс Гольджи, эндоплазматический ретикулум, фагосомы и лизосомы

Принципиальные отличия организации и функционирования клеток прокариот



Принципиальные отличия организации и функционирования клеток прокариот

- Клеточные мембраны лишены стерина (холестерина)**
- У прокариот отсутствует митоз. Они размножаются путем бинарного деления и существуют в гаплоидном состоянии, вследствие чего диплоидность эукариот, имеющая огромное значение в их эволюции, не играет никакой роли в эволюции прокариот.**
- У прокариот отсутствует также клеточный центр. Для них нетипичны внутриклеточные перемещения цитоплазмы и амебовидное движение.**

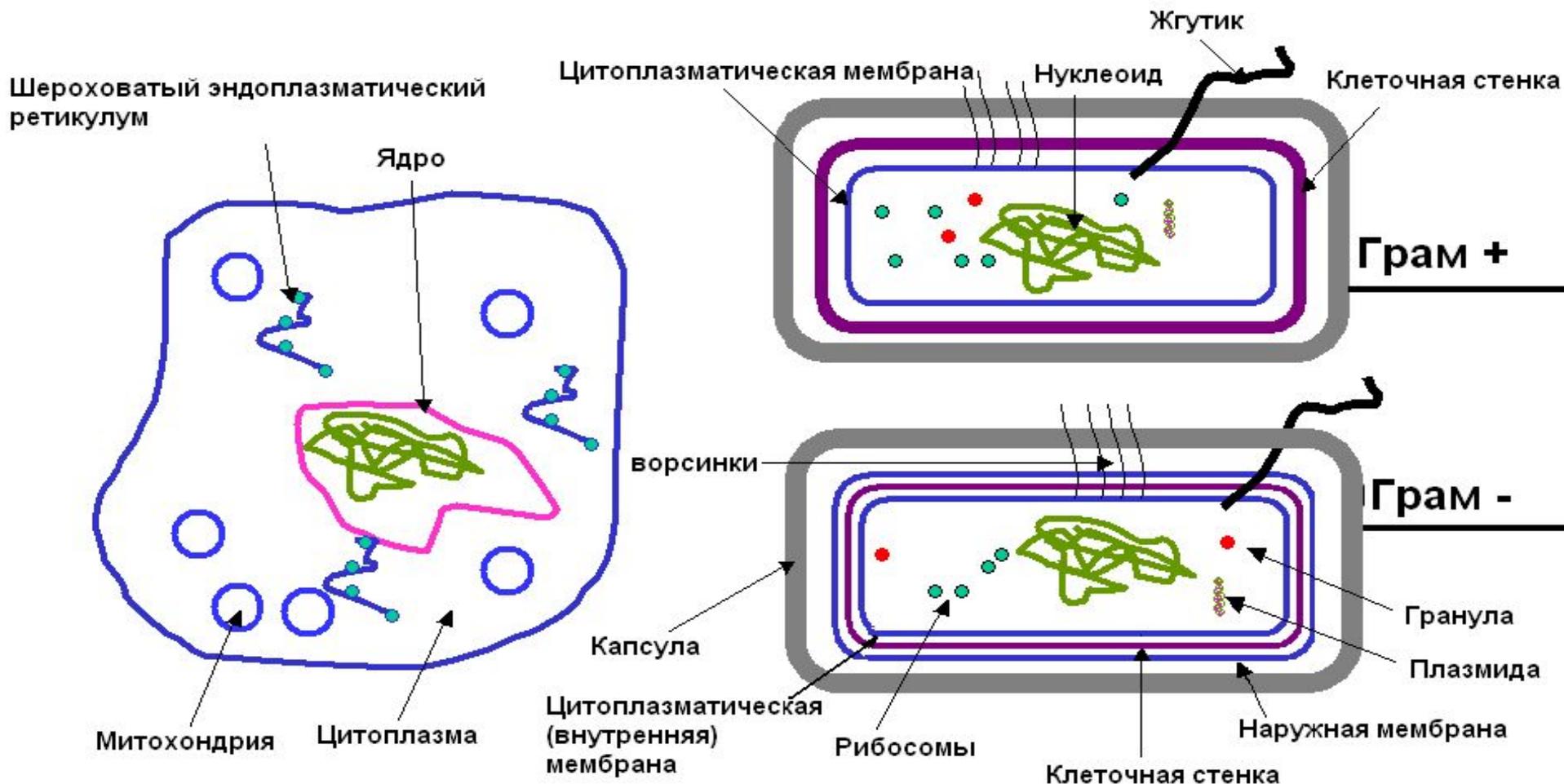
Различия бактерий и архебактерий

- **Бактерии (за исключением микоплазм) имеют пептидогликан (синонимы: муреин, мукопептид, скелет клеточной стенки). Пептидогликан содержит уникальный сахар – мурамовую кислоту, и встречается только у этих организмов.**
- **Архебактерии содержат псевдомуреин, который отличается по структуре от муреина бактерий**
- **16S рибосомальная РНК двух царств бактерий отличается по нуклеотидному составу.**
- **Архебактерии не патогенны и далее рассматриваться не будут.**
- **Все последующее изложение относится к бактериям.**

Принципиальные отличия организации и функционирования клеток прокариот

Эукариотическая клетка

Прокариотическая клетка



Ультраструктура бактериальной клетки

- Бактериальная клетка окружена **клеточной оболочкой**.
- **Клеточная оболочка** = клеточная стенка + цитоплазматическая мембрана
- **Клеточная стенка** = пептидогликан + прикрепленные структуры
- От их состава зависит способность клетки воспринимать анилиновые красители (тинкториальные свойства).

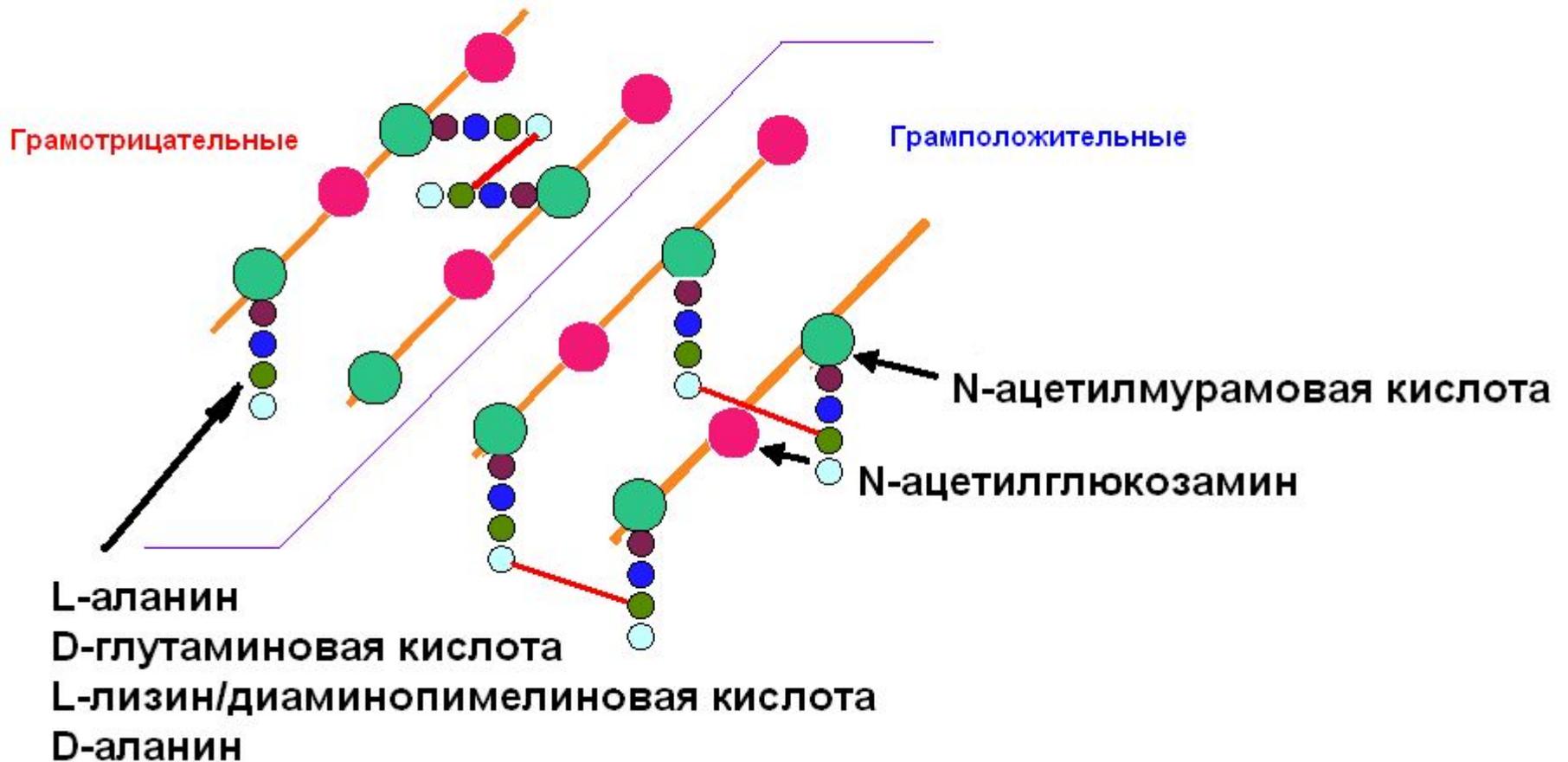
Ультраструктура бактериальной клетки

- Снаружи от цитоплазматической мембраны расположена содержащая пептидогликан жесткая *клеточная стенка*, защищающая клетку от осмотического лизиса и придающая ей форму и жесткость.
- Пептидогликан и специфические ферменты, вовлеченные в его биосинтез, являются уникальными атрибутами почти всех прокариот, за исключением *Halobacterium halobium* и микоплазм.
- Ферменты биосинтеза пептидогликана являются мишенью для специфических антибиотиков, угнетающих биосинтез пептидогликана.
- Пептидогликановый слой грамположительных бактерий значительно толще и устроен по иному, чем у грамотрицательных.

Ультраструктура бактериальной клетки

Структура пептидогликана представлена параллельными полисахаридными (гликановыми) цепями, состоящими из чередующихся звеньев **N-ацетилглюкозамина** и **N-ацетилмурамовой кислоты**. С каждым остатком данной кислоты ковалентно связан тетрапептид, в состав которого входят четыре разные аминокислоты, в том числе лизин, либо **диаминопимелиновая кислота (ДПК)**, встречающаяся только у бактерий. Каждая из упомянутых аминокислот имеет аминогруппы, образующие пептидные связи. У грамположительных бактерий (например, *Staphylococcus aureus*) пептидные цепи часто связаны поперечными пептидными мостиками, у грамотрицательных они связаны частично.

Пептидогликан



Ультраструктура бактериальной клетки

- β-1,4 гликозидные связи между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином специфически разрезаются бактериолитическим ферментом *лизоцимом*. Этот фермент присутствует в тканях и секретах человека и может вызвать полное переваривание пептидогликановых стенок чувствительных микроорганизмов.
- При переваривании лизоцимом клеточной стенки грамположительных бактерий, взвешенных в осмотическом стабилизаторе (таком, как сахароза), образуются *протопласты*. Эти протопласты способны выживать и продолжают расти в подходящей среде в виде форм, лишенных клеточной стенки.

Ультраструктура бактериальной клетки

- Грамотрицательные бактерии, обработанные таким образом, образуют *сферопласты*, которые сохраняют большую часть структуры наружной мембраны.
- Зависимость формы бактерий от пептидогликана показана превращением палочковидных бактерий в сферические протопласты (сферопласты) после ферментативного разрушения пептидогликана. Механическая защита, предоставляемая клетке пептидогликаном клеточной стенки, очевидна ввиду осмотической хрупкости протопластов и сферопластов.

Ультраструктура бактериальной клетки

- Существуют две группы бактерий, лишенных защитной структуры пептидогликана клеточной стенки – *микоплазмы и L-формы*, происходящие от грамположительных и грамотрицательных бактерий.
- L-формы названы так потому, что были открыты и описаны в Институте Листера (Lister) в Лондоне.
- Микоплазмы и L-формы грамотрицательны, не чувствительны к пенициллину и ограничены поверхностными мембранными структурами. L-формы, возникшие спонтанно в культурах или выделенные во время инфекций структурно близки к протопластам и сферопластам. Все три формы - протопласты, сферопласты и L-формы реверсируют в исходные формы редко и только в особых условиях.

Ультраструктура бактериальной клетки

- *Грамотрицательные* бактерии имеют дополнительную наружную мембрану, служащую главным барьером клетки. Пространство между внутренней и наружной мембраной называется *периплазматическим пространством*, в котором запасаются гидролитические ферменты (протеазы, фосфатазы, , осуществляющие внеклеточное переваривание.
- Переваривание необходимо для обеих групп бактерий, так как крупные молекулы с трудом преодолевают наружную и цитоплазматическую мембраны.

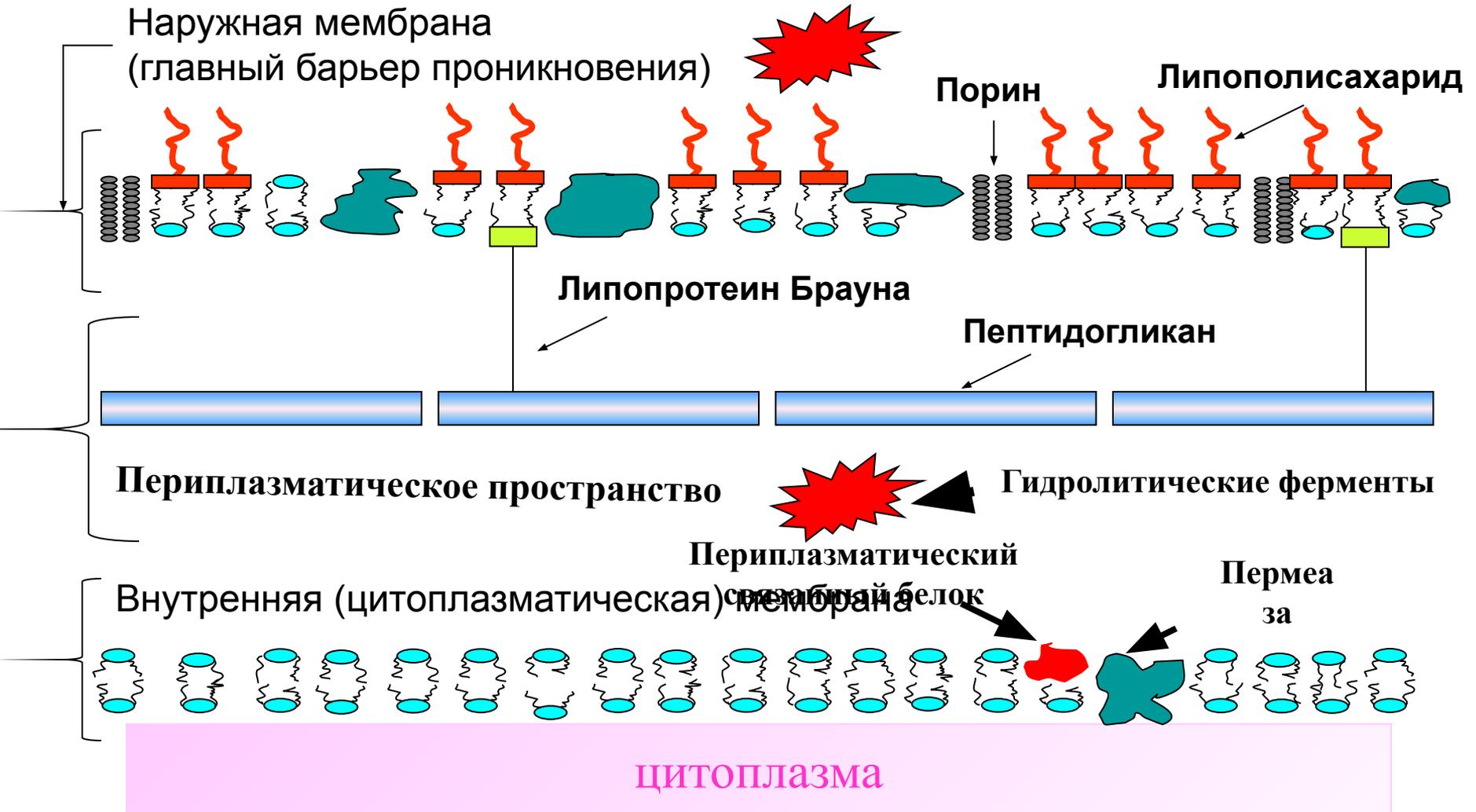
Ультраструктура бактериальной клетки

У *грамотрицательных* бактерий пептидогликан однослоен и покрыт наружной мембраной с мозаичным строением. В ее состав входит липопротеин Брауна, образующий глобулярный слой в результате ковалентной связи с пептидогликаном. Он покрыт пластинчатой мембраноподобной структурой, состоящей из фосфолипидов, липополисахарида (ЛПС) и белков.

- Наружная мембрана пронизана белками-поринами - своеобразными выводными каналами, которые обеспечивают диффузию химических веществ из внешней среды в микробную клетку.

Ультраструктура бактериальной клетки

Клеточная оболочка грамотрицательных бактерий



Ультраструктура бактериальной клетки

Особое значение имеет ЛПС, содержащийся в значительном количестве в составе КС грамотрицательных бактерий. В структуре ЛПС имеется три звена: основное (базисное), к одному концу которого присоединен липид (второе звено), а к противоположному - повторяющиеся звенья сахаров (третье звено), составляющих детерминантную группу. ЛПС обладает антигенными (О-антиген) и токсическими свойствами и поэтому часто называется эндотоксином

Базисное звено (ядро, core) представляет собой полисахарид, у грамотрицательных бактерий, включающий глюкозу (Гл), галактозу (Гал), М-ацетилглюкозамин (Ац-Гл) и 2-кето-3-дезоксиктонат (КДО). Повторяющиеся звенья детерминантной группы неодинаковы у разных видов бактерий. В них входят галактоза, манноза, рамноза, N-ацетилглюкозамин и редко встречающиеся сахара [абеквоза, колитоza (Кол), тивелоза и др.].

Липополисахарид



Ультраструктура бактериальной клетки

- **Грамположительные** бактерии не имеют периплазматического пространства, не запасают гидролитических ферментов, а выделяют их во внешнюю среду, переваривание происходит снаружи бактериальной клетки
- **Тейхоевые кислоты**, производные риботола или глицерина, это полимеры, имеющие сильный отрицательный заряд. У некоторых грамположительных бактерий они связаны ковалентно с пептидогликаном, пронизывают его насквозь или находятся на его поверхности. Они сильные антигены, но как правило, отсутствуют у грамотрицательных бактерий.
- **Липотейхоевые кислоты** имеют такое же строение, но закреплены в цитоплазматической мембране, также пронизывают пептидогликан или располагаются между ним и цитоплазматической мембраной. Они обладают антигенными, цитотоксическими и адгезивными свойствами (например, у *Streptococcus pyogenes*).

Ультраструктура бактериальной клетки

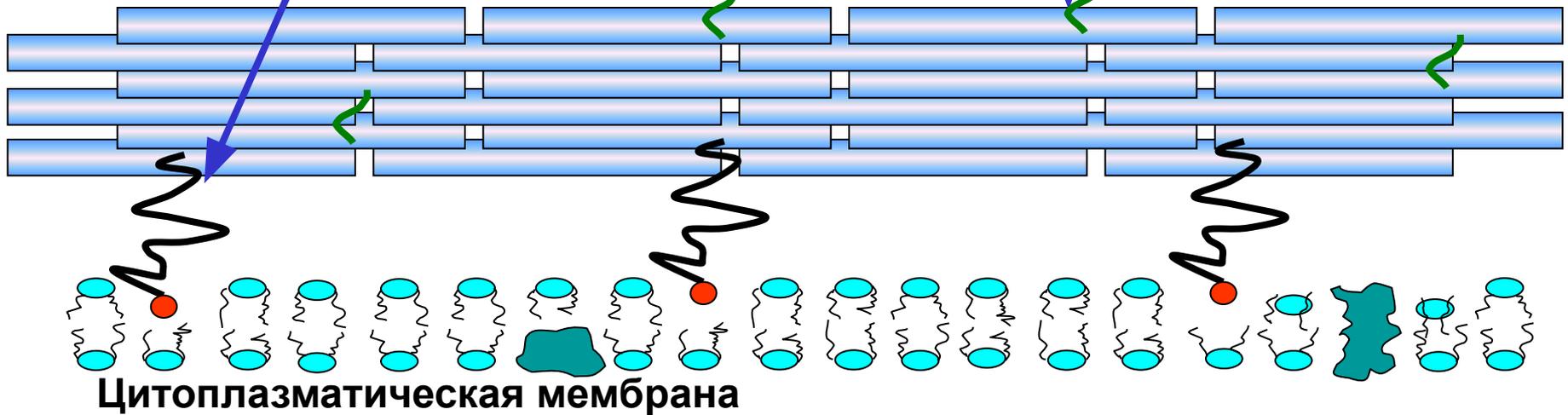
Клеточная оболочка грамположительных бактерий

Гидролитические ферменты



Липотейхоевая кислота

Пептидогликан-тейхоевая кислота



Цитоплазма

Клеточная оболочка бактерий

Фундаментальные различия поверхностных структур грамположительных и грамотрицательных бактерий объясняют результаты их окрашивания по Граму.

- Оба типа бактерий поглощают одинаковое количество генцианвиолета (ГВ) и раствора Люголя (Л). Комплекс ГВ-Л, однако, задерживается внутри грамположительных клеток благодаря обезвоживанию и низкой пористости толстой клеточной стенки на этапе отмывания 95% спиртом или другими растворителями.

- Напротив, тонкая клеточная стенка и наличие возможных ее прерывностей в местах присоединения мембраны не препятствуют вымыванию комплекса ГВ-Л растворителями из грамотрицательных клеток.

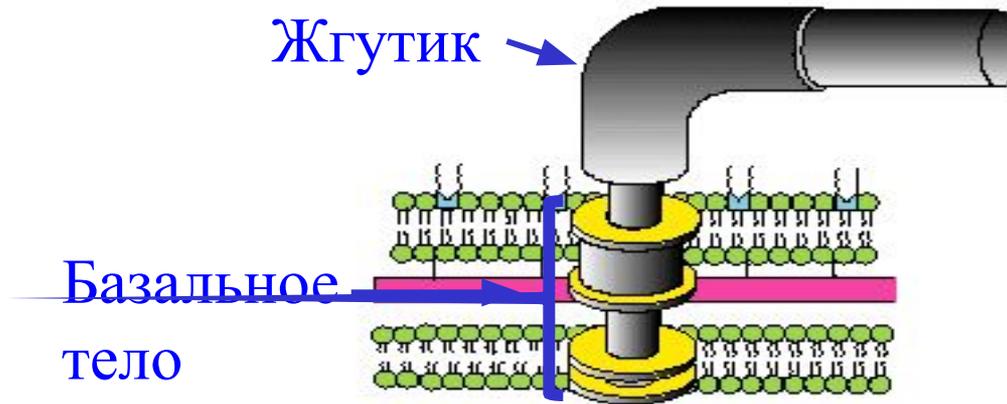
Клеточная оболочка бактерий

Кроме того, механическое нарушение клеточной стенки грамположительных бактерий или ее ферментативное удаление лизоцимом приводит к полному вымыванию комплекса ГВ-Л и переходу в грамотрицательную реакцию. Поэтому действие аутолитических ферментов, вызывающих разрывы в клеточной стенке может являться причиной грамотрицательной или грамвариабельной реакции культур грамположительных бактерий, таких как стафилококки, клостридии, коринебактерии и некоторые виды бацилл.

Ультраструктура бактериальной клетки

- **Жгутики**
 - Встроены в цитоплазматическую мембрану и прикрепляются к базальному телу, состоящему из системы нескольких дисков, вмонтированных в цитоплазматическую мембрану и КС
 - Выступают из клетки как нити
 - В их состав входит белок флагеллин (типа сократительного белка миозина)
 - Придают клетке движения, действуя как пропеллер
 - Обладают антигенными свойствами (H-антиген)

Ультраструктура бактериальной клетки



Количество и расположение жгутиков у разных бактерий неодинаково:

Монотрихи имеют на одном из полюсов только один жгутик



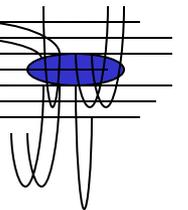
Амфитрихи - жгутики расположены на обоих полюсах клетки



Лофотрихи - пучок жгутиков на одном из полюсов



Перитрихи - жгутики расположены по всей ее поверхности



Фибриллы

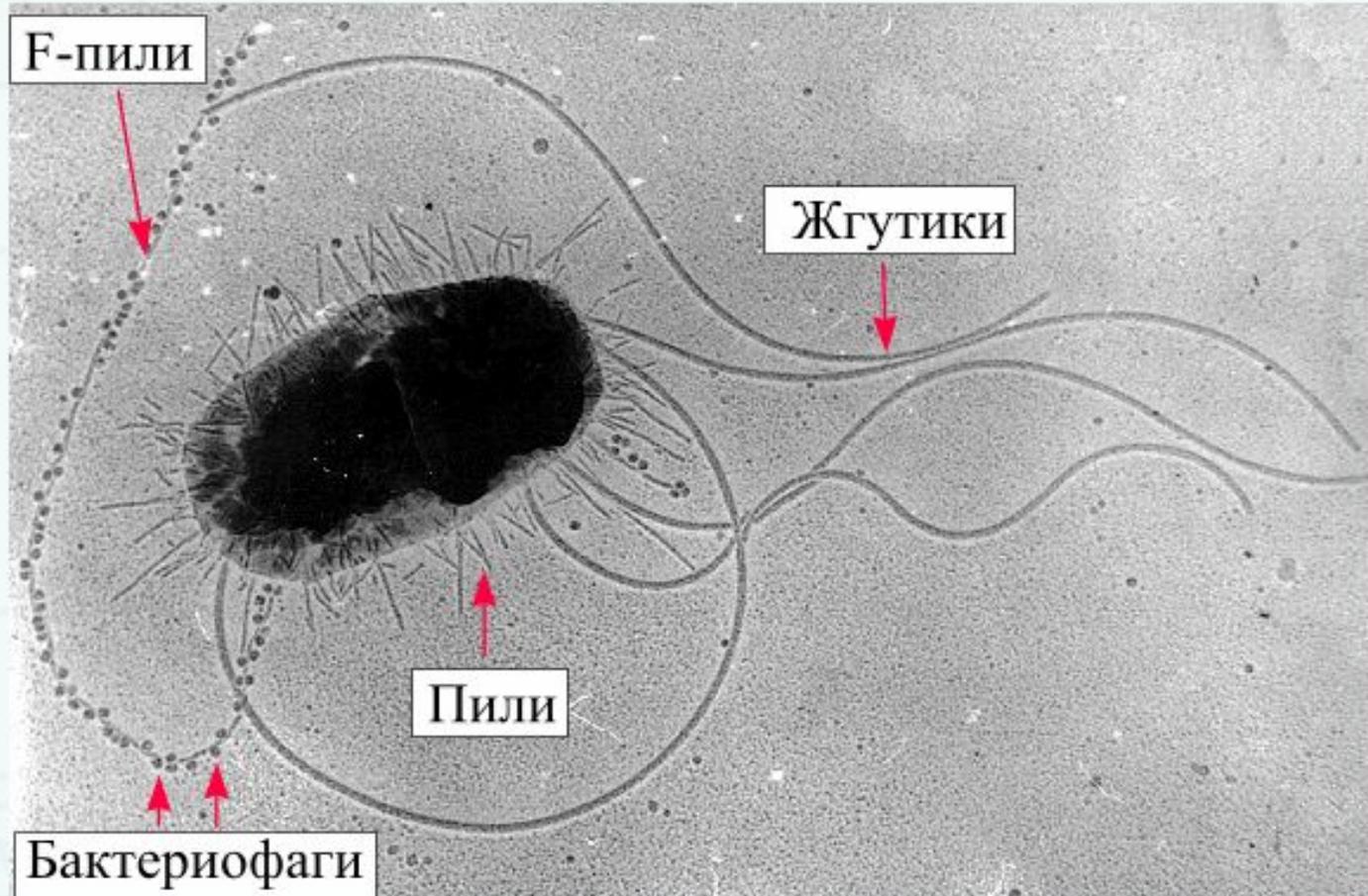
- **Имеются у спирохет**
 - **Подобны по функциям жгутикам и также состоят из флагеллина**
 - **Проходят по всей длине клетки между цитоплазматической мембраной и цитоплазмой**
 - **Обеспечивают змееподобное движение**

Пили (ворсинки, фимбрии)

- Тонкие полые нити белковой природы длиной 0,3-10 мкм, толщиной 10 нм, покрывающие поверхность бактериальных клеток. В отличие от жгутиков не выполняют локомоторную функцию. По своему функциональному назначению подразделяются на несколько типов.
- Пили 1 общего типа обуславливают прикрепление или адгезию бактерий к определенным клеткам организма хозяина. Их количество велико - от нескольких сотен до нескольких тысяч на одну бактериальную клетку. Адгезия является первоначальной стадией любого инфекционного процесса.
- Пили 2 типа (синоним: конъюгативные, или половые, пили — sex pili, F-пили) участвуют в конъюгации бактерий, обеспечивающей перенос части генетического материала от донорной клетки к реципиентной. Они имеются только у бактерий-доноров в ограниченном количестве (1-4 на клетку).

Ультраструктура бактериальной клетки

Электроннограмма клетки кишечной палочки



Видны: ● жгутики; ● многочисленные, расположенные вокруг клетки, тонкие ворсинки (пили); ● половая ворсинка (F-пили), на которой адсорбированы "мужские" сферические бактериофаги.

Ультраструктура бактериальной клетки

Цитоплазматическая мембрана (ЦМ)

• Является жизненно необходимым структурным компонентом бактериальной клетки. Она ограничивает протопласт, располагаясь непосредственно под клеточной стенкой.

• ЦМ в химическом отношении представляет собой липопротеин, состоящий из 15-30% липидов и 50-70% протеинов. Кроме того, в ней содержится около 2-5% углеводов и незначительное количество РНК. В состав мембранных липидов входят главным образом нейтральные липиды и фосфолипиды. У некоторых бактерий встречаются гликолипиды, а у микоплазм — стеролы.

• Липидный состав мембран непостоянен в качественном и количественном отношении. У одного и того же вида бактерий он изменяется в зависимости от условий ее культивирования на питательной среде и возраста культуры.

Ультраструктура бактериальной клетки

- Разные виды бактерий отличаются друг от друга по липидному составу своих мембран.
- Мембранные белки разделяются на структурные и функциональные
- К последним относятся ферменты, участвующие в биосинтезе разных компонентов КС, который происходит на поверхности ЦМ, а также окислительно-восстановительные ферменты
- ЦМ является сложно организованной структурой, состоящей из трех слоев, которые выявляются при электронно-микроскопическом исследовании. Двойной фосфолипидный слой пронизан глобулинами, которые обеспечивают транспорт веществ в бактериальную клетку.

Ультраструктура бактериальной клетки

- ЦМ выполняют жизненно важные функции, нарушение которых приводит клетку к гибели. К ним относится прежде всего:
 - Регуляция поступления в клетку метаболитов и ионов,
 - Участие в метаболизме
 - Участие в репликации ДНК
 - Участие у ряда бактерий в спорообразовании.

Ультраструктура бактериальной клетки

- *Мезосомы* являются производными ЦМ. Они имеют неодинаковое строение у разных бактерий, располагаясь в разных частях клетки либо в виде концентрических мембран, либо пузырьков, трубочек, либо в форме петли, характерной в основном для грамотрицательных бактерий.
- Мезосомы связаны с нуклеоидом.
- Они участвуют в делении клетки и спорообразовании.
- В них локализованы окислительно-восстановительные ферменты.

Ультраструктура бактериальной клетки

Капсулы и слизистые слои.

- Это структуры, составляющие самый наружный слой внешней оболочки. Более выраженные называют капсулами, менее выраженные – **слизистыми слоями** или **гликокаликсом**.
- Обычно они состоят из полисахаридов, однако у сибиреязвенного микроба капсула представлена полипептидом d-глутаминовой кислоты. Они не являются жизненно необходимыми, некоторые штаммы одного и того же вида продуцируют капсулу, другие нет.
- Капсулы патогенных бактерий угнетают фагоцитоз и внутриклеточное переваривание фагоцитированных клеток. Они выполняют **защитную** функцию, предохраняя клетку от неблагоприятных условий среды обитания и **адгезивную**, способствуя прилипанию к поверхности клетки хозяина.

Капсула *B. anthracis* (1000X)



Споры и спорообразование.

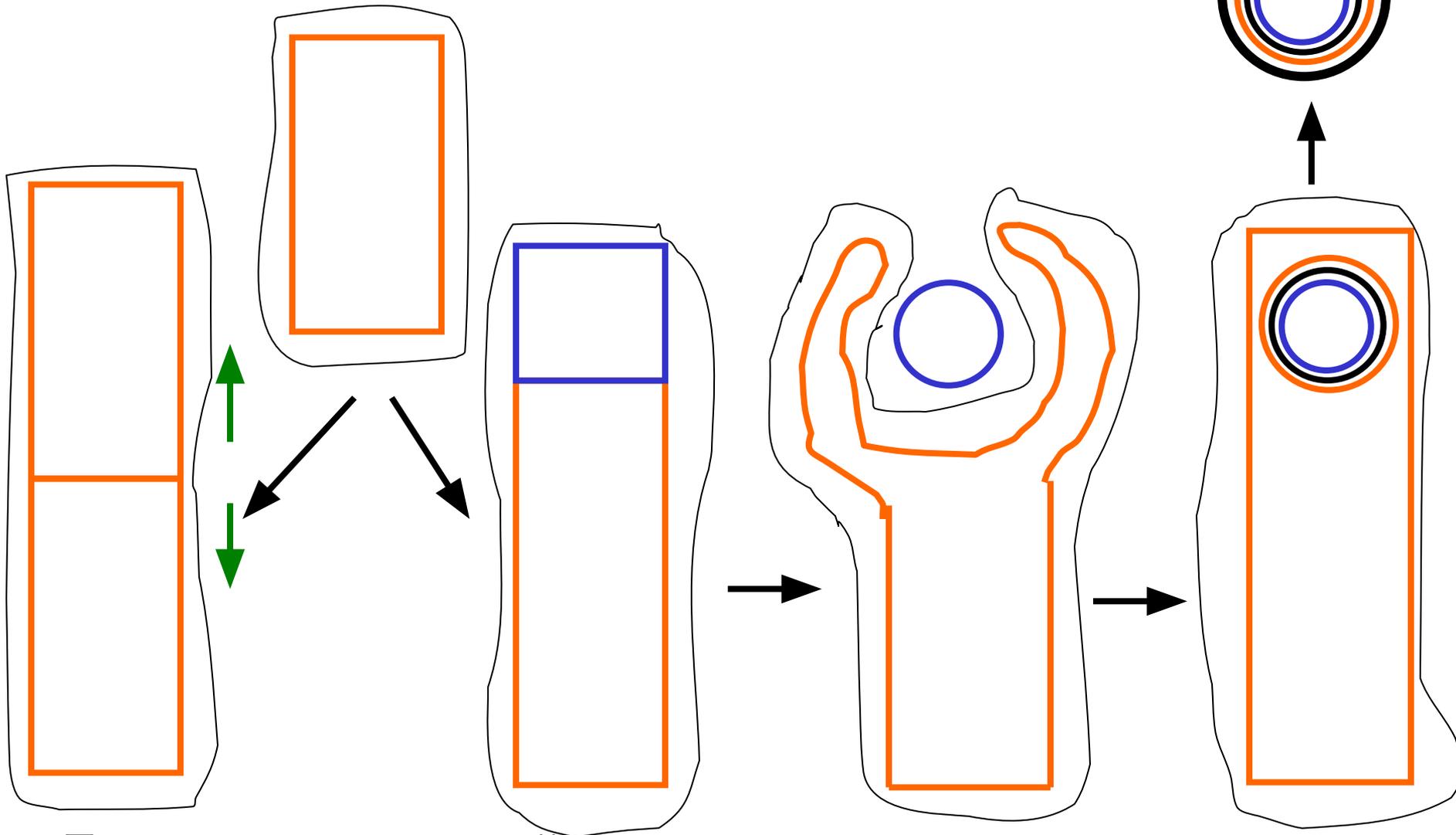
- Споры бактерий можно рассматривать как форму сохранения наследственной информации бактериальной клетки в неблагоприятных условиях внешней среды.
- Способностью к спорообразованию обладает сравнительно небольшое число как патогенных, так и непатогенных бактерий. К первым относятся бактерии родов *Bacillus*, *Clostridium*, ко вторым — сапрофитные представители упомянутых родов и некоторые кокки.

Ультраструктура бактериальной клетки

•Процесс спорообразования начинается с формирования спорогенной зоны внутри бактериальной клетки, представляющей собой уплотненный участок цитоплазмы с расположенным в нем нуклеоидом. Затем происходит образование *проспоры* путем изолирования спорогенной зоны от остальной части цитоплазмы с помощью врастающей внутрь клетки ЦМ. Между внутренним и наружным слоями последней образуется *кортекс*, состоящий из особого пептидогликана.

•В дальнейшем внешняя сторона мембраны покрывается плотной оболочкой, в состав которой входят белки, липиды и другие соединения, не встречающиеся у вегетативных клеток.

Ультраструктура бактериальной клетки



**Деление вегетативной
клетки**

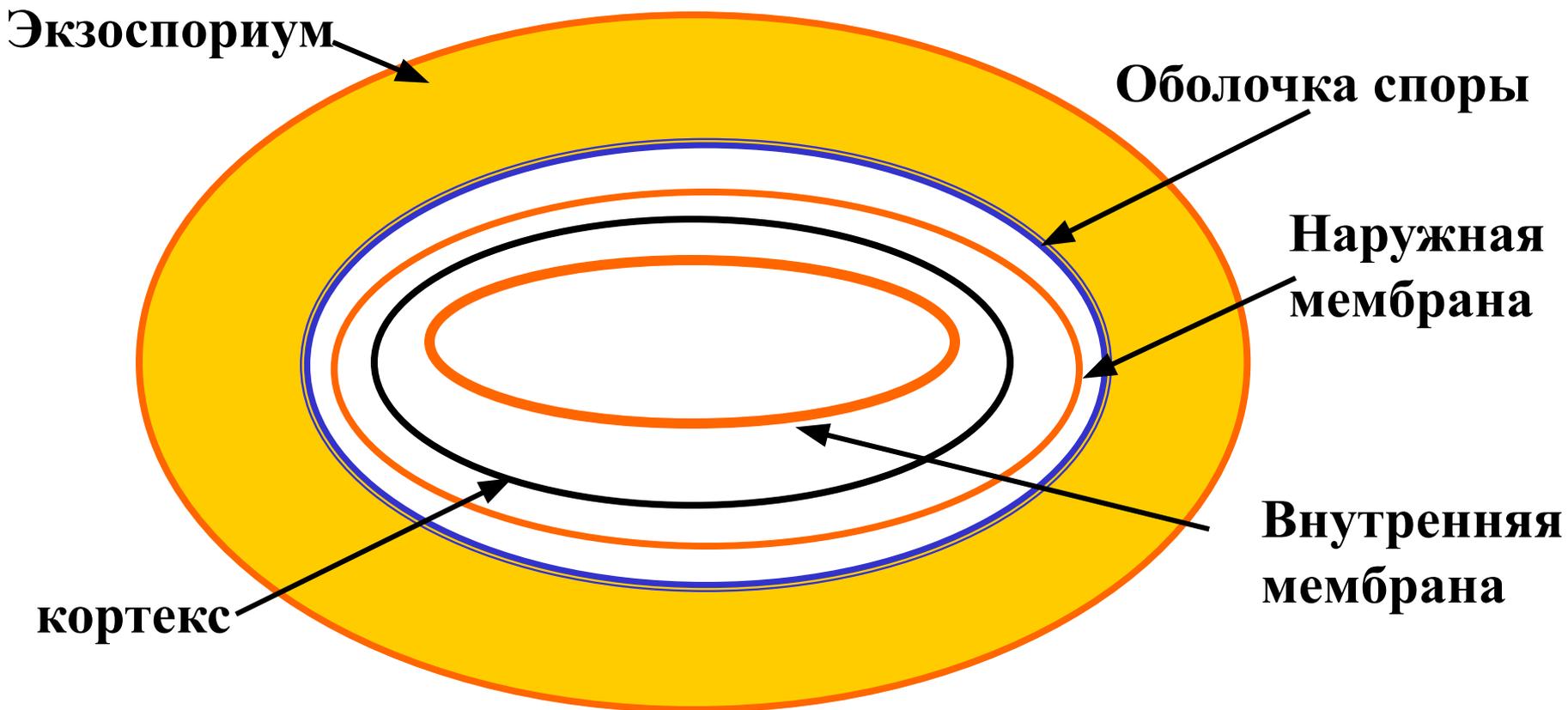
Споруляция

Ультраструктура бактериальной клетки

•К ним относятся *дипиколиновая кислота*, обуславливающая термоустойчивость споры, и др. Затем вегетативная часть клетки отмирает, и спора сохраняется во внешней среде в течение длительных сроков, измеряемых многими месяцами и годами.

•Способность ряда патогенных бактерий образовывать длительно сохраняющиеся во внешней среде споры, обладающие высокой термоустойчивостью, обусловлена низким содержанием воды, повышенной концентрацией кальция, структурой и химическим составом ее оболочки.

Эндоспора



Ультраструктура бактериальной клетки

- **Чрезвычайно высокая устойчивость спор к физическим и химическим факторам имеет существенное эпидемиологическое значение, поскольку способствует сохранению источника инфекции и загрязнению окружающей среды.**
- **Споры многих патогенных бактерий выдерживают кратковременное кипячение, устойчивы к действию небольших концентраций дезинфектантов. Загрязнение спорами патогенных бактерий поврежденных участков кожи может привести к возникновению раневой инфекции и столбняка.**

Ультраструктура бактериальной клетки

• В благоприятных условиях спора прорастает в вегетативную клетку. Спора набухает, что связано с увеличением в ней количества воды, активированием ферментов, участвующих в энергетическом и пластическом метаболизме. Далее происходит 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.

• Вместе с тем способность бактерий образовывать споры, различающиеся по форме размерам и локализации в клетке, является таксономическим признаком, который используется для их дифференцировки и идентификации.

Ультраструктура бактериальной клетки

• *Цитоплазма* у прокариот, так же как и у эукариот, представляет собой сложную коллоидную систему, состоящую из воды (около 75%), минеральных соединений, белков, РНК и ДНК, которые входят в состав органелл нуклеоида, рибосом, мезосом, включений.

• *Нуклеоид* является эквивалентом ядра эукариот, хотя отличается от него по своей структуре и химическому составу. Он лишен ядерной мембраны, не делится митозом. В составе нуклеоида отсутствуют основные белки - гистоны. Исключение составляют только некоторые бактерии. В нем содержится двунитевая молекула ДНК, а также небольшое количество РНК и белков.

Ультраструктура бактериальной клетки

• Молекула ДНК с молекулярной массой $(2-3) \times 10^9$ D представляет собой замкнутую кольцевую структуру, в которой закодирована наследственная информация клетки. По аналогии с хромосомами эукариот бактериальная ДНК часто обозначается как хромосома. При этом следует помнить, что она представлена в клетке в единственном числе, поскольку бактерии являются гаплоидными. Однако перед делением клетки число нуклеоидов удваивается, а во время деления увеличивается до 4 и более.

Ультраструктура бактериальной клетки

- Как правило, геном бактерий представлен одной хромосомой - кольцевой молекулой ДНК.
- Некоторые патогенные бактерии имеют две хромосомы, например, *Vibrio cholerae* и *Brucella*
- Кроме хромосом, геном многих бактерий включает внехромосомные кольцевые суперспирализованные молекулы ДНК, *плазмиды*.
- Плазмиды обычно имеют несколько копий и кодируют факторы патогенности, устойчивости к антибиотикам, размножения.

Ультраструктура бактериальной клетки

• *Рибосомы* у бактерий представляют собой рибонуклеопротеиновые частицы размером 20 нм, состоящие из двух субъединиц 30S и 50S. Перед началом синтеза белка происходит объединение этих субъединиц в одну — 70S. В отличие от клеток эукариотов, рибосомы бактерий не объединены в эндоплазматическую сеть. Бактериальные рибосомы, являющиеся белоксинтезирующими системами клеток, могут стать «мишенью» для действия многих антибиотиков.

Ультраструктура бактериальной клетки

• *Включения* являются продуктами метаболизма прокариотических микроорганизмов, которые располагаются в цитоплазме и используются в качестве запасных питательных веществ. К ним относятся включения гликогена, крахмала, серы, полифосфата (волютина) и др. У некоторых бактерий, например дифтерийной палочки, включения волютина имеют дифференциально-диагностическое значение. Они обладают способностью к метакромазии (окрашиваются в иной цвет, чем цвет красителя).