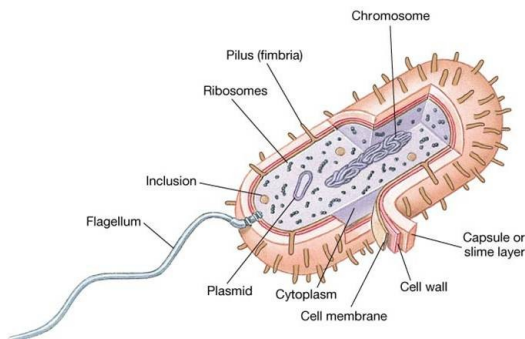


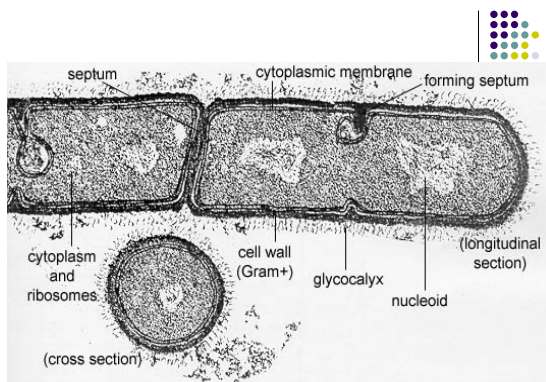
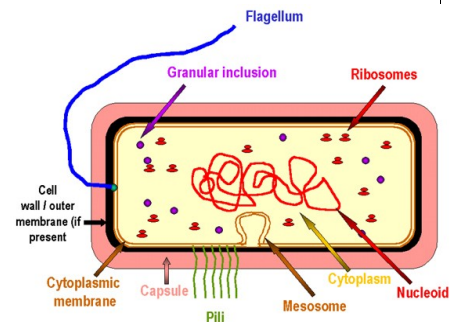
ULTRASTRUCTURA BACTERIILOR.

ELEMENTELE PERMANENTE ȘI NEPERMANENTE DE STRUCTURĂ



ELEMENTELE DE STRUCTURĂ ALE CELULEI BACTERIENE

- **Elementele constante (permanente, obligatorii)**
 - Peretele celular
 - Membrana citoplasmatică
 - Citoplasma
 - Nucleoidul
 - Ribosomii
 - Mezosomii
- **Elementele inconstante (nepermanente, neobligatorii)**
 - Capsula
 - Sporul
 - Flagelii
 - Pili/fimbriile
 - Plasmidele
 - Incluziunile celulare



PERETELE CELULAR (PC)

- Reprezintă un înveliș rigid ce înconjoară protoplastul bacterian. Lipsește la micoplasme.
 - Se disting 2 mari grupe de bacterii în funcție de structura PC:
 1. Bacterii gram-negative (G-)
 2. Bacterii gram-pozitive (G+)
 (1884, savantul danez Christian GRAM).
- Elementul comun al ambelor grupe – **peptidoglicanul (PG)**.

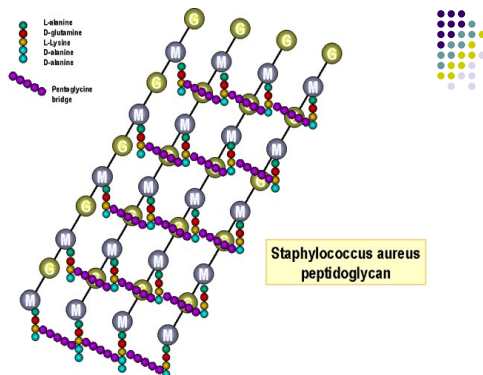
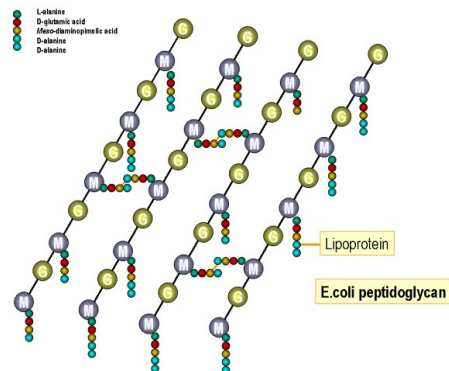
PEPTIDOGLICANUL (PG)

- **PG** – structură particulară rigidă a PC bacterian.
- **Structura PG:**

Heteropolimer macromolecular reticulat, constituit dintr-un component **glicanic** și unul **peptidic**.

Partea **glicanică** (polizaharidică) este constituită din catene liniare paralele în care alternează **N-acetyl-glucozamina** cu **acidul N-acetyl-muramic**.

Partea **peptidică** este reprezentată de **unități tetrapeptidice** (izomeri L și D de AA), fixate de acidul muramic, care pot fi legate între ele direct (formând o structură bidimensională, la bacterii G-) sau prin **punți interpeptidice** (structură tridimensională, la bacterii G+).



- Acidul diaminopimelic, izomerii D ai AA și acidul muramic se întâlnesc doar la celulele procariote.
- Fragmente solubile de mureină pot stimula secreția excesivă a citokinelor de către macrofage, prin legarea de receptorii toll-like sau CD14, inducând astfel simptome de șoc septic
- PG reprezintă ținta de atac a unor substanțe:
 1. Lizozimul, care taie legăturile dintre N-AGA și acidul N-AM (catena glicanică)
 2. Unele antibiotice (beta-lactamine, glicopeptide, fosfomicina), care perturbă procesul de transpeptidare.

PERETELE CELULAR AL BACTERIILOR GRAM-POZITIVE

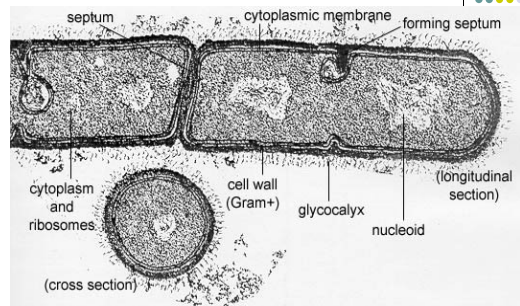
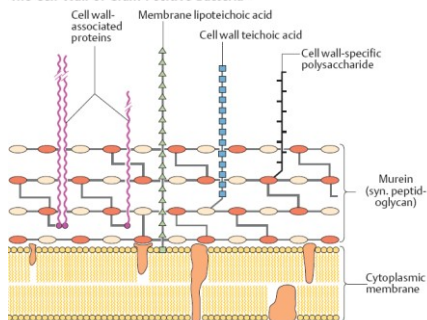
- Uniform, cu pori mici
- Grosimea 20-80 nm (până la 300 nm)
- Componentul major (40-80%) reprezintă **PG** (structură reticulată tridimensională)
- Componente minore:
 1. **Acizii teichoici** (polimeri de glicerol sau ribitol fosfat), fixați de N-AGA. Traversează PG și crează sarcină electrică negativă la suprafața bacteriei, asigură transferul de ioni și fixarea unor proteine, funcție antigenică. Pot activa complementul pe cale alternativă și stimula secreția citokinelor de către macrofage.

2. **Acizii lipoteichoici:** se fixează de MCP și depășesc stratul de PG.

Funcții: identic cu acizii teichoici, intervin în adeziunea la celule și au un efect toxic slab.

3. **Proteine** asociate peretelui celular: proteina A, coagulaza legată ("clumping factor") și proteina fixatoare de fibronectină la *Staphylococcus aureus*, proteina M la *Streptococcus pyogenes* (rol în adeziune la substrate, protecție de fagocitoză)
4. La unele bacterii G+ (de exemplu: *Mycobacterium*, *Nocardia*) peretele conține o cantitate importantă de **lipide sau ceruri**, la altele (ex.: streptococi) peretele conține multe **glucide**.

The Cell Wall of Gram-Positive Bacteria



PERETELE CELULAR AL BACTERIILOR GRAM-NEGATIVE

- Grosimea 10-12 nm
- Neomogen, format din straturi distincte:
- 1. **PG**, stratul intern, constituie 1-10% din masa uscată a peretelui celular. Acizii teichoici lipsesc. Nu există punți interpeptidice (structură bidimensională).
- 2. **Membrana externă (ME)** – dublu strat lipidic cu proteine înserate (proteine majore – 70%, minore – 30%).

Unele **proteine majore** - porine, unindu-se în triplete, participă la formarea porilor, altele (nonporine) – au funcție de receptor pentru bacteriofagi și pili sau asigură adeziunea la receptorii celulelor-gazde.

Proteinele minore sunt enzime implicate în captarea unor substanțe și transportul specific transmembranar.

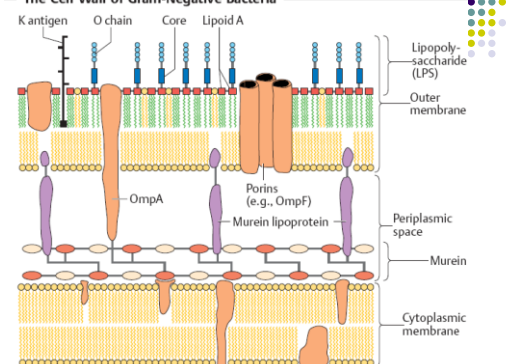
ME este permeabilă pentru ioni și mici molecule hidrofile și impermeabilă pentru molecule hidrofobe sau amfipatice

3. **Lipoproteinele** asigură legătura dintre ME și PG

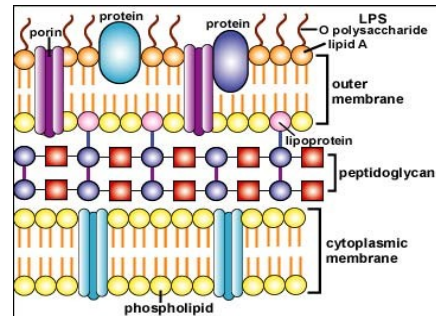
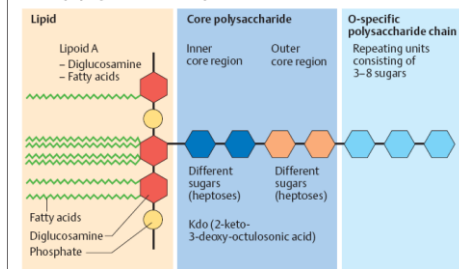
4. **Lipopolizaharidul (LPZ)** – stratul extern al peretelui gram-negativ. Este format din:

- **Lipidul A** (endotoxină), glicolipid ancorat în ME. Stimulează formarea și secreția citokinelor. Determină efectul toxic al bacteriilor G- manifestat în urma lizei celulare.
- **Polizaharide complexe**, fixate pe lipidul A. Participă în procese de penetrare și transport a unor substanțe, conferă specificitate de gen (**antigenul R**)
- La exterior, subunități **oligozaharidice** liniare sau ramificate. Crează sarcină negativă la suprafața bacteriei (împiedică fagocitoza, accesul moleculelor toxice), conferă specificitate de specie sau tip (**antigenul O**)

The Cell Wall of Gram-Negative Bacteria



The Lipopolysaccharide Complex

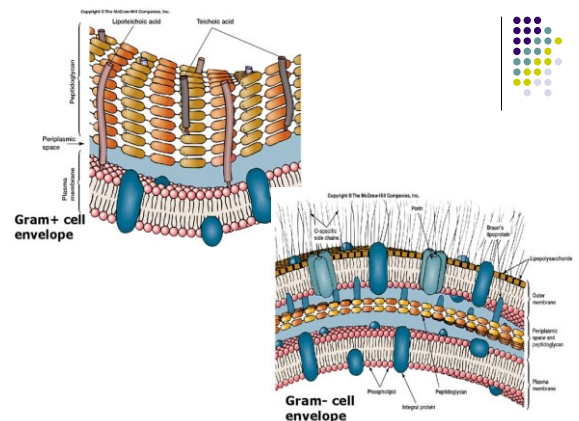
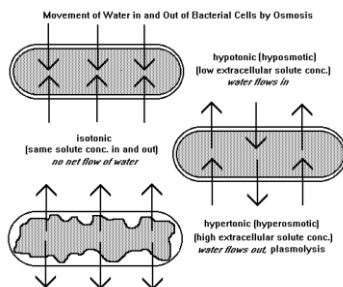


Spațiul periplasmic este regiunea dintre ME și

MCP. Conține PG și proteine-enzime implicate în transport, digestia nutrienților, protecția contra substanțelor toxice (ex.: beta-lactamazele, care distrug antibioticele beta-lactamice).

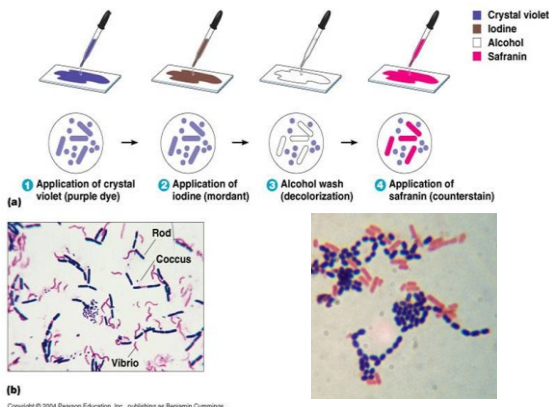
La bacteriile G⁺ aceste enzime sunt secrete în mediul extern.

Evidențierea peretelui celular: microscopia electronică, metode speciale de colorare, plasmoliză (în mediu hipertonic), plasmoptiză (în mediu hipotonic).



• FUNCȚIILE PERETELUI CELULAR

1. Conferă forma bacteriilor
2. Barieră osmotică și mecanică
3. Barieră de permeabilitate selectivă
4. Funcție antigenică (Ag O și R)
5. Participă la procesele de creștere și diviziune celulară
6. Funcție de receptor
7. Responsabil de aderența specifică la substrate
8. Componente ale peretelui celular (lipidul A, acizii lipoteichoici, fragmente de PG) contribuie la producerea citokinelor și activarea complementului pe cale alternativă cu manifestarea șocului septic (endotoxinic)
9. Reprezintă ținta de atac a unor enzime și antibiotice

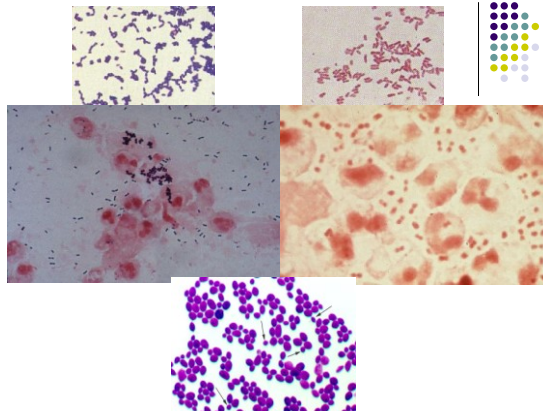


Determinarea tipului peretelui celular

COLORAȚIA GRAM (condiționată de structura și compoziția chimică a peretelui celular)

1. Colorarea frotiului fixat cu violet de gențiană (citoplasma bacteriilor se colorează în violet)
2. Spălarea cu apă apoi tratarea cu soluție Lugol (I_2 + KI) – fixează colorantul în celule prin formarea complexului insolubil violet-iodin
3. Decolorarea cu alcool 95%. Bacteriile G+ păstrează colorantul, cele G- se decolorează.
4. Recolorarea bacteriilor G- cu fucsina apoasă

Rezultat: bacteriile G+ apar colorate în violet, bacteriile G- în roșu.



- **Mecanismul:** Peretele G- este subțire, conține multe lipide (20%), care sunt dizolvate de alcool, porii au diametrul mare, pH citoplasmei este slab acid (se decolorează cu alcool);

Peretele G+ este gros, nu conține lipide sau foarte puține, alcoolul deshidratează peretele și reduce diametrul porilor, pH acid (colorantul nu este spălat din citoplasmă)

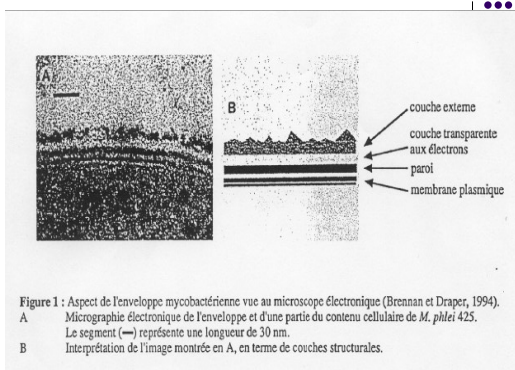
- **Utilizarea practică a colorației Gram:**

1. Diagnostic
2. Orientare în tratament (sensibilitate diferită la antibiotice)

• Acidorezistența bacteriilor

Unele bacterii G+ (Mycobacterium, Nocardia) conțin în componența peretelui multe lipide, acizi grași și ceruri (70% din greutatea peretelui). Aceasta le conferă rezistență marcantă în mediul extern și sensibilitate distinctă la antibiotice.

Colorația **Ziehl-Neelsen** permite diferențierea acestor bacterii după proprietatea lor de acido-alcoolo-rezistență

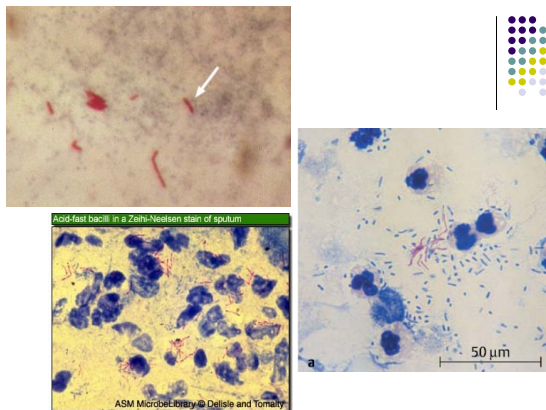


• METODA DE COLORARE ZIEHL-NEELSEN

Principiul: bacteriile acido-rezistente colorate cu fucsină fenicată încălzită nu pot fi decolorate de acizi sau alcool.

1. Frotiul se colorează cu fucsină fenicată, încălzind lama până la apariția vaporilor (2 - 3 ori)
2. Se clătește cu apă, apoi se tratează cu soluție de acid sulfuric de 5%
3. După spălare frotiul se recolorează cu albastru de metilen

Rezultatul: bacteriile **acido-rezistente** rămân colorate în roșu, cele **acido-nerezistente** se decolorează, apoi se recolorează în albastru

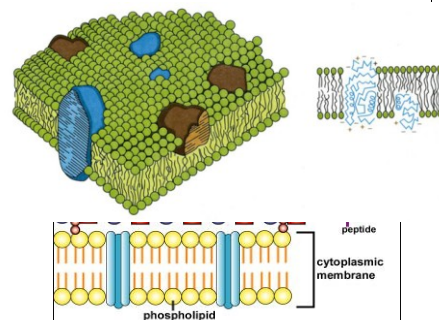


- Sub influența unor substanțe (lizozim, antibiotice) PG poate fi deteriorat, iar bacteria "explodează" din cauza presiunii osmotice ridicate (5-20 atm). În mediu echilibrat osmotic pot fi obținute forme particulare:
- **Protoplastul** - reprezintă o structură sferică totalmente lipsită de perete celular. El este obținut din bacterii G+
- **Sferoplastul** - structură sferică sau neregulată parțial lipsită de perete celular. Este o bacterie G- lipsită de peptidoglican și înconjurată de ME și MCP
- Bacteriile care prezintă un deficit în PG sunt numite **forme L** (descoperite la institutul Lister). Ele se pot forma sub influența antibioticelor betalactamice. Sunt instabile față de variații osmotice și rezistente la betalactamine. Pot fi reversibile sau ireversibile

MEMBRANA CITOPLASMATICĂ (MCP)

Prezintă o structură membranară clasică: dublu strat fosfolipidic în care sunt înserate proteine și glicoproteine. **Lipsesc steroli.**

La bacteriile gram-pozitive MCP formează invaginații, **mezosomi** (septali, laterali), în care se conțin enzime, citocromi și proteine ale sistemului transportor de electroni.



Proteinele MCP:

1. PFP (Proteine Fixatoare de Penicilină), enzime ce catalizează legăturile dintre catenele peptidice din PG – reacția de transpeptidare (sunt inactivate de penicilină și antibiotice beta-lactamice)
2. Componente ale sistemului de transport (permeaze)
3. Proteine ale sistemelor de secreție (I – V). Reprezintă cilindre proteice ce traversează învelișurile celulei bacteriene. Asigură transportul proteinelor din interiorul celulei bacteriene spre exterior
4. Proteine – receptori
5. Enzime ale lanțului respirator

• Funcțiile membranei citoplasmatic

1. Barieră osmotică și de permeabilitate selectivă
2. Asigură transportul activ prin intermediul permeazelor
3. Excreția enzimelor hidrolitice, toxinelor, etc
4. Sediul metabolismului energetic (mezosomi)
5. Intervine în diviziunea celulară (mezosomi)
6. Implicare în sinteza PG și a fosfolipidelor
7. Implicare în chemotaxie prin receptori specifici
8. Asigură transmiterea informației din mediul înconjurător spre interiorul celulei bacteriene

• Evidențierea MCP

1. Microscopia electronică
2. Fenomene de *plasmoliză* (în mediu hipertonic – retracția citoplasmei) sau *plasmoptiză* (în mediu hipotonic – liza celulei, desprinderea MCP de peretele celular)

CITOPLASMA

- Necompartimentată
- Lipsesc organele celulare
- Formată din apă (80%), conține nucleoidul, ribosomi (aprox. 20 000 per celulă), incluziuni, plasmide, ioni, enzime, deșeurile, etc.
- Consistența densă (stare de gel) asigură permanența mediului intern
- pH acid

Funcții: sediul tuturor proceselor metabolice

Evidențierea: prin orice metodă de colorare

NUCLEOIDUL BACTERIAN

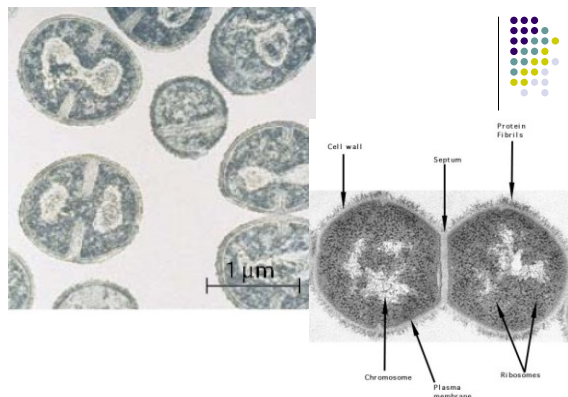
- Constituit din ADN bicatenar circular, uneori liniar, plasat liber în citoplasmă. ADN este repliat în bucle și stabilizat prin ARN și proteine. Fiecare buclă este hiperspiralizată sub acțiunea ADN-girazei și topoizomerazei IV (se întâlnesc doar la bacterii). Pe ADN sunt fixate enzime de sinteză (ADN -, ARN - polimeraze)

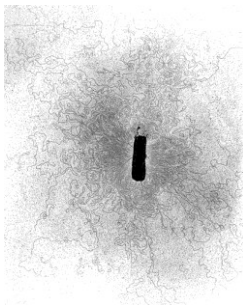
Funcții: dirijază activitatea celulei (procesele de sinteză, creșterea, multiplicarea, diferențierea celulei, replicarea proprie, etc)

Evidențierea:

- Microscopia electronică
- Metode speciale de colorare (Feulgen)

Feulgen: HCl....aldehida....react. Schiff....culoare roșie





• PLASMIDELE

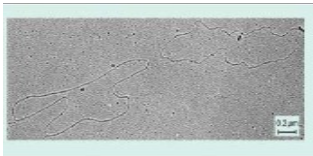
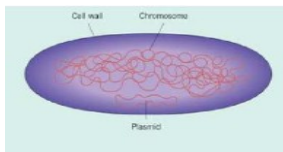
- Elemente genetice (ADN) extracromozomiale, capabile de replicare autonomă. Conferă bacteriei caractere suplimentare. Se transmit celulelor-fiice la diviziunea bacteriei. Plasmidele conjugative F se transmit prin conjugare.

Episom - plasmida integrată în cromosom

- Tipuri de plasmide:

1. **F** – factor de fertilitate, conjugative (sinteza pililor F)
2. **R** – rezistență la antibiotice
3. **Ent** – producerea enterotoxinei
4. **Hly** – producerea hemolizinei
5. **Col** – producerea de bacteriocine

Utilizarea practică: în tehnologii de ADN-recombinant



SPORUL BACTERIAN

- Reprezintă o diferențiere celulară care asigură supraviețuirea bacteriei în condiții nefavorabile ale mediului extern.
- Bacterii sporogene – **Bacillus, Clostridium**. Aceste mi/o se prezintă sau sub *formă vegetativă*, metabolic activă, sau sub formă inertă metabolic – *sporul*.
- Procesul de formare a sporului este numit **sporogeneză, sporulare**. Este declanșat în special de carențe nutritive sau condiții nefavorabile ale mediului extern.

• Stadiile sporogenezei (durata 36-72 ore)

Stadiul I – se formează filamentul axial, compus din ADN

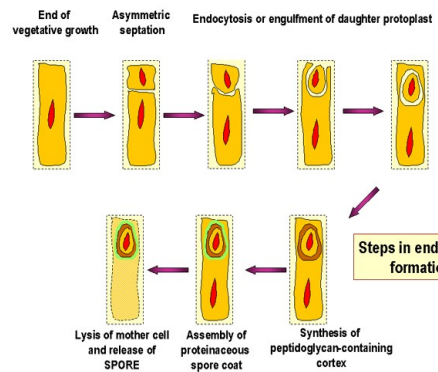
Stadiul II – divizarea asimetrică a citoplasmei printr-un sept, formarea **presporului**, care conține un filament de ADN. MCP înglobează presporul.

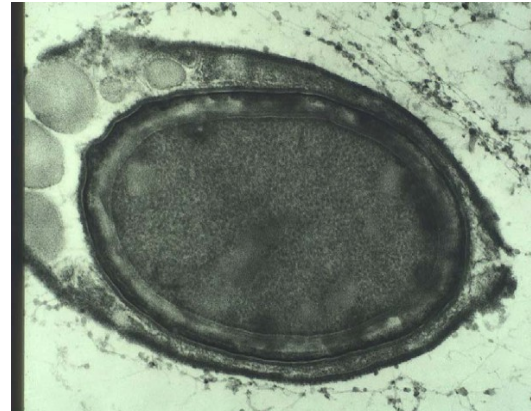
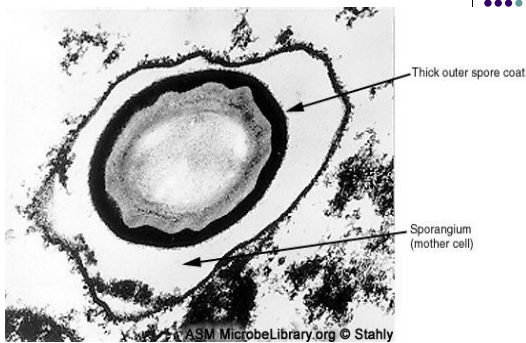
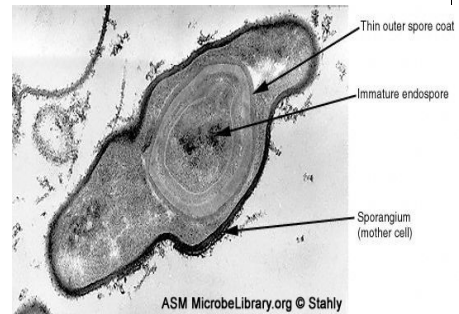
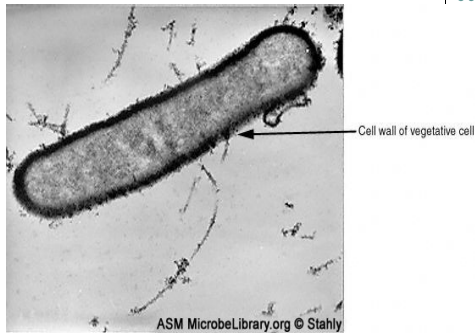
Stadiul III – înglobarea completă a presporului, care este limitat de 2 membrane

Stadiul IV – formarea **cortexului** de PG între cele 2 membrane

Stadiile V-VI – formarea **tunicii proteice** la exterior și maturarea sporului. Uneori se formează un înveliș extern suplimentar - **exosporiu**

Stadiul VII – **sporul matur** este eliberat iar celula-mamă se dezintegrează





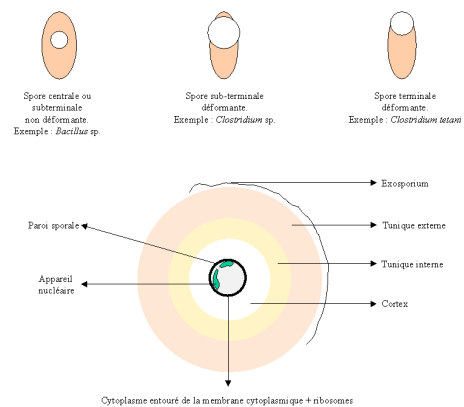
• Proprietățile sporului

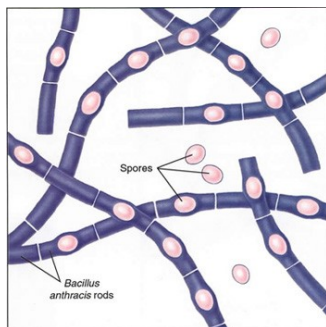
- Inactiv metabolic
- Conținut scăzut de apă liberă
- Conținut mare (până la 10%) în dipicolinat de calciu
- Rezistent la temperaturi și pH extreme, desicare, radiații, agenți chimici și fizici

În condiții favorabile sporul germinează, dezvoltându-se forma vegetativă.

Forma sporului (sferică, ovală) și poziția în celulă (centrală, subterminală, terminală) sunt caractere utile în identificarea bacteriilor.

Evidențierea sporilor: colorarea după **AUJESZKY** (sporul se colorează în roșu, iar **citoplasma** în albastru)





CAPSULA

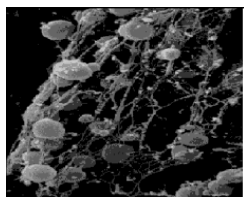
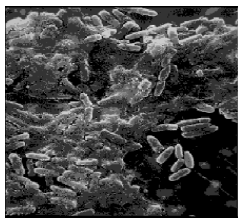
- învelișul extern al unor bacterii.

Reprezintă polimeri organici sintetizați în mediul natural de viață al bacteriilor (exemplu: în macroorganism).

Se disting:

- **Capsula adevărată** (peste $0,2\mu\text{m}$), vizibilă la microscopul optic
- **Microcapsula**, detectată la microscopul electronic
- **Capsula flexibilă** (slime, glicocalix), o rețea laxă de fibre polizaharidice, care difuzează în mediu. Nu se evidențiază microscopic. Asigură formarea **biofilmelor bacteriene** – ansamblu structurat de celule bacteriene înglobate într-o matrice de polimeri de origine bacteriană, care poate adera la suprafețe inerte (ex.: cateter, stimulator cardiac, endoproteze, sonde de intubare, etc) sau țesuturi vii.

Dental Plaque



- **Compoziția chimică a capsulei:** apă și substanțe organice (polizaharide, mucopolizaharide, peptide)
- *Bacillus anthracis* – acid glutamic
- *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* – polizaharide
- *Streptococcus pyogenes* – acid hialuronic

• Funcțiile capsulei:

- Impiedică desicarea bacteriei
- Barieră de permeabilitate pentru substanțe toxice (antibiotice, ioni metalici)
- Barieră protectoare față de factori antiinfecțioși (complement, fagocite), bacteriofagi, protozoare
- Rezervă nutritivă
- Asigură aderența bacteriei la substrat – țesuturi sau suporturi inerte (placa dentară, biofilm pe catetere, proteze, instrumente, etc)
- Specificitate antigenică de specie sau tip (Ag K)

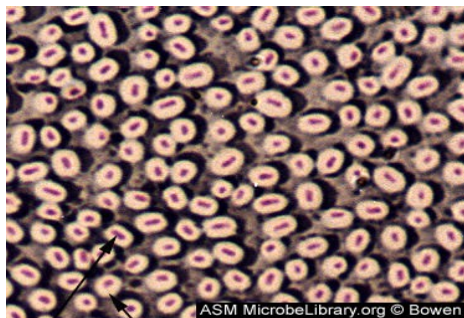
• Evidențierea capsulei

Colorația Burri-Hins (metodă negativă)

- Pe lamă se amestecă suspensia bacteriană cu tuș de China, se etalează, se usucă
- Frotiul se fixează cu alcool
- Se colorează frotiul cu fuchsina apoasă

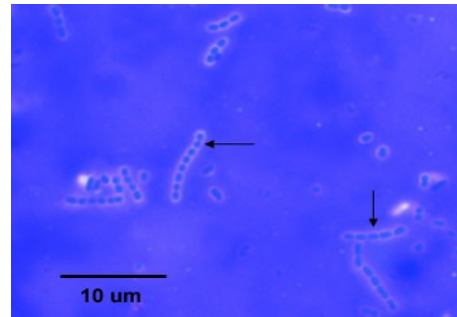
Rezultatul: capsula apare ca un halou incolor pe fondul negru. Citoplasma bacteriilor se colorează în roșu.

Colorația Romanovski – Giemsa (capsula se colorează în roz) – colorație pozitivă a capsulei

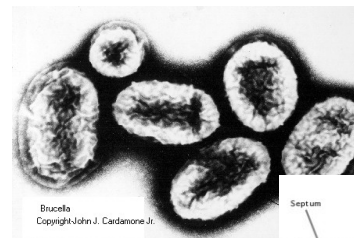
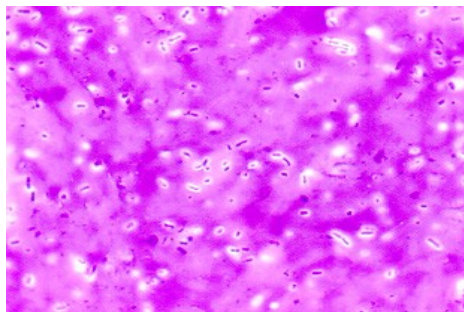


Cell
Capsule

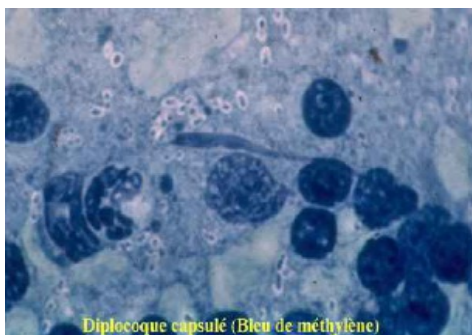
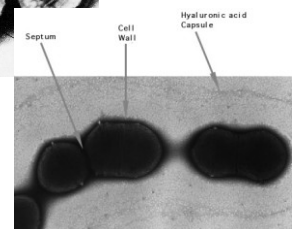
ASM MicrobeLibrary.org © Bowen



10 µm



Brucella
Copyright John J. Cardamone Jr.



Diplocoque capsulé (Bleu de méthylène)

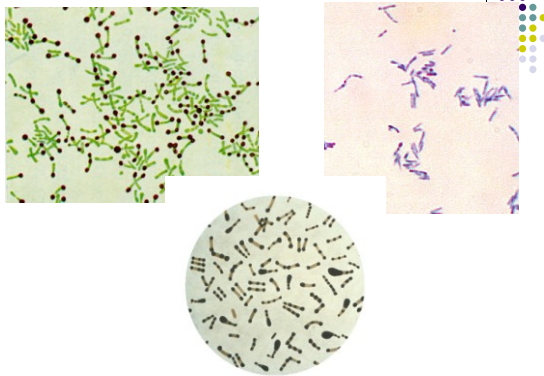
GRANULAȚIILE DE VOLUTINĂ

Reprezintă polimeri anorganici de polimetafosfat. Servesc în calitate de rezervă de fosfați și pot interveni în metabolismul energetic.

Interesul medical: la agentul difteriei, *Corynebacterium diphtheriae*, granulele de volutină se localizează la extremitățile celulei, iar la corynebacterii nepatogene sunt repartizate neuniform în citoplasmă.

La tratarea cu unii coloranți bazici granulele de volutină se colorează în altă culoare, de ex. în roșu-violet la colorarea cu albastru de metilen – fenomenul metacromaziei.

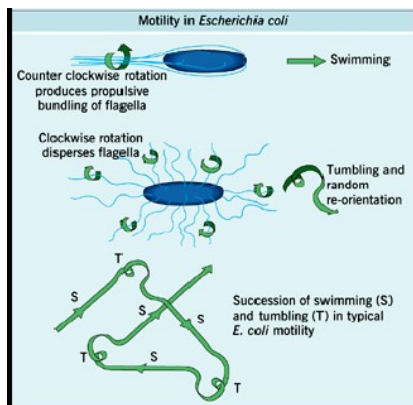
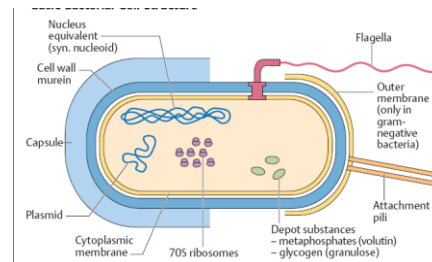
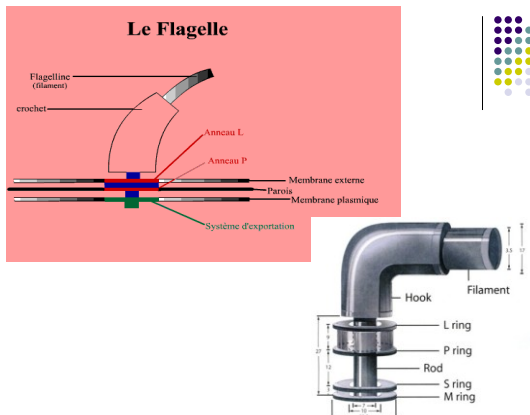
Evidențierea: metoda Loeffler, metoda Neisser



FLAGELII

- structuri filamentoase proteice, întâlnite la bacterii, bacili, spirili și spirochete.
- **Funcții:** intervin în mobilitatea bacteriană, reprezintă Ag H al bacteriilor.
- **Structura flagelului:**
 - **Filamentul**, structură helicoidală constituită din fibrile proteice (flagelină) răsucite
 - **Cârligul de articulație**
 - **Corpul bazal**, constituit dintr-un ax rigid și mai multe inele ce servesc la fixarea flagelului (la MCP și PC).

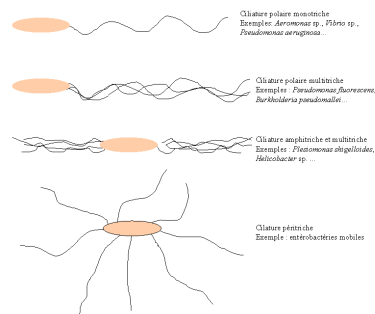
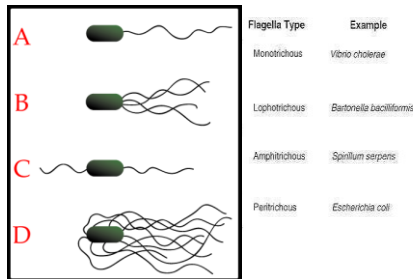
Mobilitatea bacteriei este asigurată de rotația flagelului (30 – 70 micrometri/s).



Tipurile de bacterii după dispoziția flagelilor

- Bacterii **monotriche**
- Bacterii **lofotriche** (un mănunchi de flageli la o extremitate)
- Bacterii **amfitriche** (câte un flagel sau un mănunchi de flageli la fiecare extremitate)
- Bacterii **peritriche** (flageli pe toată suprafața celulei)

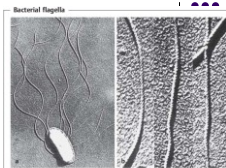
La spirochete flagelii se plasează în spațiul periplasmic – flageli interni, periplasmatici.



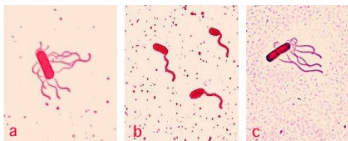
• Evidențierea flagellilor

I - metode directe

- Microscopia electronică

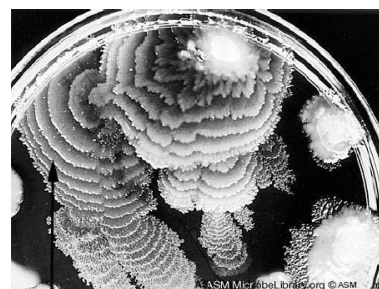
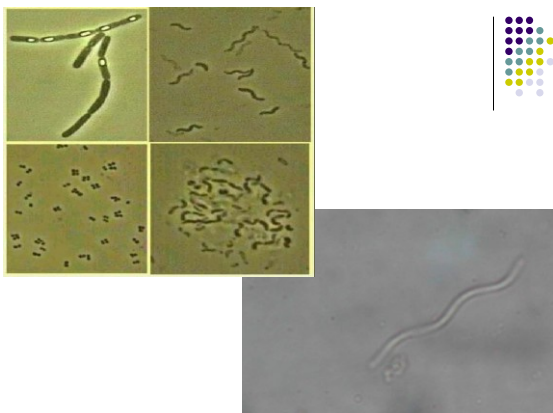
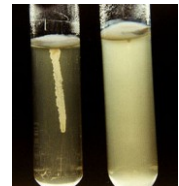


- Colorația specială Loeffler (mordansarea cu taină, săruri de aluminiu, Fe, apoi colorarea cu fucsină sau albastru de metilen)



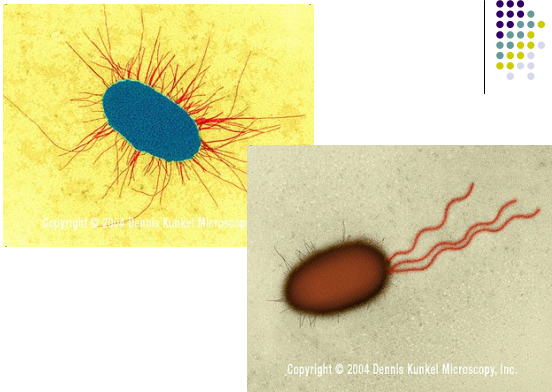
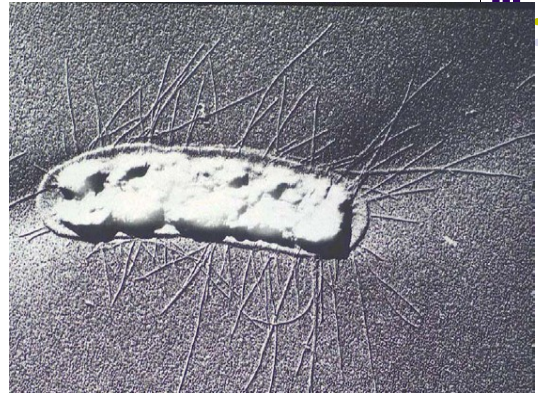
II - metode indirecte (studierea mobilității bacteriilor)

- Studiarea preparatelor native "picătură suspendată" sau "între lamă și lamelă" (microscopia cu contrast de fază sau pe fond negru)
- Însămânțarea culturii bacteriene în medii semisolide (se observă turbiditate)
- Creșterea culturii "în vâl" pe suprafața mediului solid



Proteus mirabilis swarm motility spreading over an agar plate. A swarm colony originating from a spot of less than 10^4 bacteria can cover a 9-cm-diameter petri dish in about 12 to 16 hours at 32°C.

- **Pilii comuni (fimbriile)** – elemente proteice fine, rigide, scurte repartizate pe suprafața celulei bacteriene G - în special. Sunt formate din subunități proteice identice (pilina), implantate în ME.
- Numărul fimbriilor per celulă: 1 – sute
- **Funcții:** asigură adeziunea bacteriilor la suprafețe inerte, la celule sau alte bacterii, reprezintă antigenul F



- **Pilii conjugativi** – structuri capiliforme de natură proteică, prezenți în număr de 1-10 per celulă (numai la bacteriile ce găzduiesc plasmide conjugative F).
- **Funcții:** transferul de ADN prin conjugare, receptori pentru unii bacteriofagi
- **Evidențierea pililor:** microscopia electronică