

Кафедра микробиологии и вирусологии

Физиология микроорганизмов.
Питание, рост, размножение,
дыхание, метаболизм. Влияние
факторов внешней среды.

План лекции

- Химический состав бактерий
- Клеточный метаболизм
- Конструктивный метаболизм
- Типы питания бактерий
- Механизмы проникновения веществ
- Ферменты микроорганизмов
- Типы дыхания бактерий
- Рост и размножение бактерий
- Питательные среды

Физиология микроорганизмов изучает биохимические и энергетические процессы, которые происходят в бактериальной клетке и обеспечивают воссоздания ее структурного материала и энергетические потребности.

Химический состав бактерий.

Как и все живые существа, бактериальная клетка состоит из четырех основных элементов - азота, углерода, водорода, кислорода. Углерод составляет 45- 55 % сухого остатка клетки, кислород - 25-30 %, азот - 8-15 % и водород - 6-8 %. Эти органогены служат материалом, из которого построены все составные компоненты клетки: нуклеиновые кислоты, белки, липиды, углеводы, многочисленные ферментные системы и тому подобное.

Тонкие физико-химические исследования позволили установить, что в клетке насчитывается свыше 2,4 млн. многообразных белковых молекул 1850 видов

Белок	55 %	2,4 млн. мол
РНК	20,5%	250 тыс. мол.
ДНК	3,1 %	2 молекулы
Липиды	9,1 %	22 млн. молекул
Липополисахари ды	3,4 %	1,5 млн. молекул
Пептидогликан	2,5 %	1 молекула

Клеточный метаболизм. Совокупность всех биохимических превращений в клетке называется метаболизмом. Он происходит за двумя основными направлениями.

Первый обеспечивает синтез сложных клеточных соединений из более простых. Потому он получил название **биосинтез, конструктивный метаболизм** или **анаболизм**.

Однако подавляющее большинство реакций синтеза и распада нуждаются в энергетическом обеспечении.

Потому **энергетический метаболизм** или **катаболизм** представляет собой поток реакций, которые сопровождаются накоплением электрохимической энергии, что потом используется клеткой.

Конструктивный и энергетический метаболизм - тесно связанный между собой комплекс превращений, часто их пути совпадают, и одни и те же вещества используются для разных потребностей. В этом случае такие субстраты называются **амфиболитами**, а пути - **амфиболичными**.

Конструктивный метаболизм прокариотов. Для того, чтобы клетка могла существовать, должен происходить постоянный обмен веществ с окружающей средой. В клетку извне должен поступать пластичный материал, из которого она синтезирует все необходимые ей молекулы.

В конструктивном метаболизме ведущая роль принадлежит соединениям углерода, из которого построены все живые организмы. В зависимости от того, какой углерод усваивают бактерии, они разделяются на две группы: **автотрофы** и **гетеротрофы**.

Автотрофы (autos - сам, trophe - питание) способен синтезировать все необходимые им органические соединения CO_2 как единственного источника углерода.

Гетеротрофы (heteros - другой) - микроорганизмы, источником углерода для которых являются органические соединения. Они способны потреблять любые простые и сложные углеродные соединения - сахара, аминокислоты, многоатомные спирты, парафин и др.

Степень выражения гетеротрофии у бактерий может быть самая разнообразная. Наивысшую гетеротрофность имеют прокариотические организмы, которые способны жить только внутри живых клеток (риккетсии, хламидии). Их метаболические пути полностью зависят от организма хозяина. Такие микроорганизмы называют **облигатными** (суровыми) паразитами.

Однако много микробов можно выращивать на искусственных питательных средах, в состав которых входят белки, пептиды, витамины, фрагменты нуклеиновых кислот. Такие формы бактерий, способных рост вне клеток человека или животных при создании необходимых условий, называют **факультативными паразитами**.

Большинство бактерий, которые населяют земной шар (свыше 99 %), принадлежат к сапрофитам. Они непосредственно от живых организмов не зависят и питаются за счет мертвых органических остатков.

Дикие штаммы бактерий способны синтезировать все необходимые им вещества из ограниченного числа органических соединений, например, глюкозы и солей аммония. Они называются **прототрофами**.

Отдельные микроорганизмы (варианты прототрофов) потеряли способность к синтезу некоторых необходимых им ростовых факторов, следовательно не могут расти на минимальных питательных средах. Их называют **ауксотрофными** организмами.

Источники энергии и доноры электронов. В зависимости от источника энергии, что усваивают микробные клетки, их разделяют на фототрофы и хемотрофы.

Фототрофные бактерии способны использовать энергию солнечного света. Их иначе называют фотосинтезирующими бактериями. Патогенных для человека среди них нет. Другие прокариоты, которые получают энергию за счет окислительно-восстановительных реакций в субстратах, называются **хемотрофами**.

Для осуществления многообразных реакций клетке необходимые электроны. Вещества, которые в процессах биохимических превращений отдают электроны, называются донорами. Молекулы, которые получают электроны, называются акцепторами.

Микроорганизмы, для которых источником электронов являются неорганические соединения типа H_2 , H_2S , NH_3^+ , Fe^{+2} но другие, называются литотрофами (litos - камень). Другие бактерии, для которых донором электронов выступают органические вещества, называются органотрофами.

В зависимости от способа получения энергии, донора электронов и источника углерода для усвоения можно выделить 8 основных типов прокариотических организмов:

фотолитоавтотрофы и фотолитогетеротрофы, фотоорганавтотрофы и фотоорганогетеротрофы, хемолитоавтотрофы и хемолитогетеротрофы, хемоорганавтотрофы и хемоорганогетеротрофы.

Микроорганизмы, которые способны вызывать у человека заболевания, принадлежат к **хемоорганогетеротрофам**

Поступление веществ в клетку. Независимо от достижения микробиологической науки в изучении процессов обмена в бактериальной клетке окончательно интимные механизмы транспорта питательных веществ в клетку и выведение метаболитов наружу не выяснены. Установлено, что микробам присущий **голофитный** тип питания, то есть они способны поглощать питательные вещества только в растворенном виде .

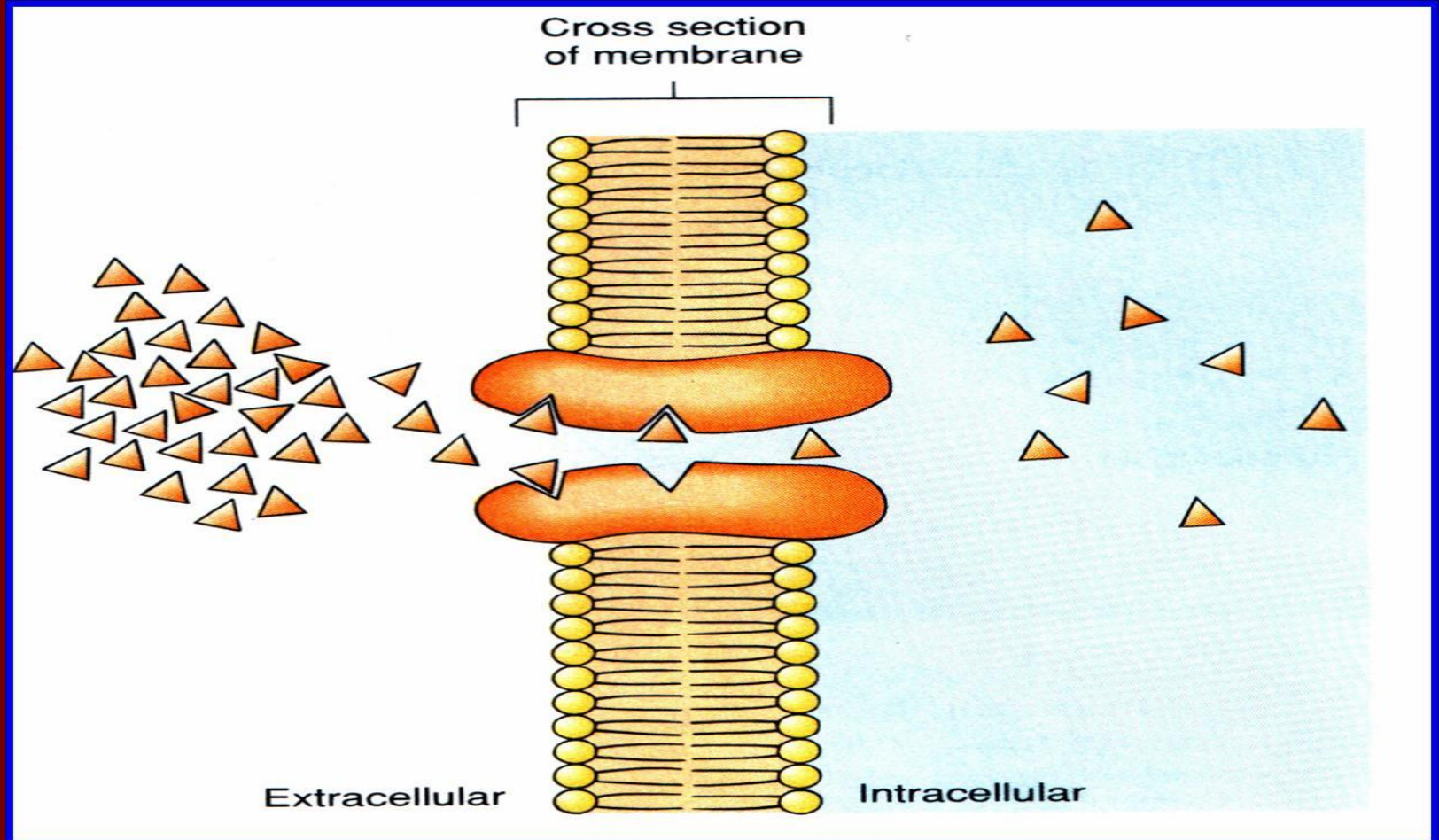
Однако некоторые субстраты не растворяются в воде (белки, полисахариды), или образуют коллоидные растворы, которые не проникают в клетку. В таком случае клеточные экзоферменты, которые выделяются в окружающую среду, вызывают гидролиз этих субстанций, расщепляя их к более простым и мелким молекулам и переводя в растворимое состояние.

Механизмы проникновения веществ

Пассивная диффузия - градиент концентрации вещества внутри бактериальной клетки и внешне одинаков. Она происходит пассивно, потому что не требует затрат энергии.

Облегченная диффузия осуществляется за счет особенных белков - пермеаз, которые содержатся в цитоплазматической мембране. Этот процесс также не требует энергетического обеспечения.

Облегченная диффузия



Большинство питательных веществ, метаболитов, ионов проникают в клетку с помощью **активного транспорта**.

Его также обеспечивают белки-пермеазы, но они являются высокоспецифическими и способны переносить только определенные субстраты. Этот процесс происходит за счет энергии, которую генерирует клетка, потому что возможный перенос и против градиента концентрации вещества.

Если этому процессу предшествует определенная химическая модификация молекулы, его называют **транслокацией химических групп**.

Выделяют также механизм **ионного транспорта**, при котором происходит перенос в клетку отдельных неорганических ионов.

ГИДРОЛАЗЫ

АДАПТИВНЫЕ

ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

КОНСТИТУТИВНЫЕ

ИЗОМЕРАЗЫ

ТРАНСФЕРАЗЫ

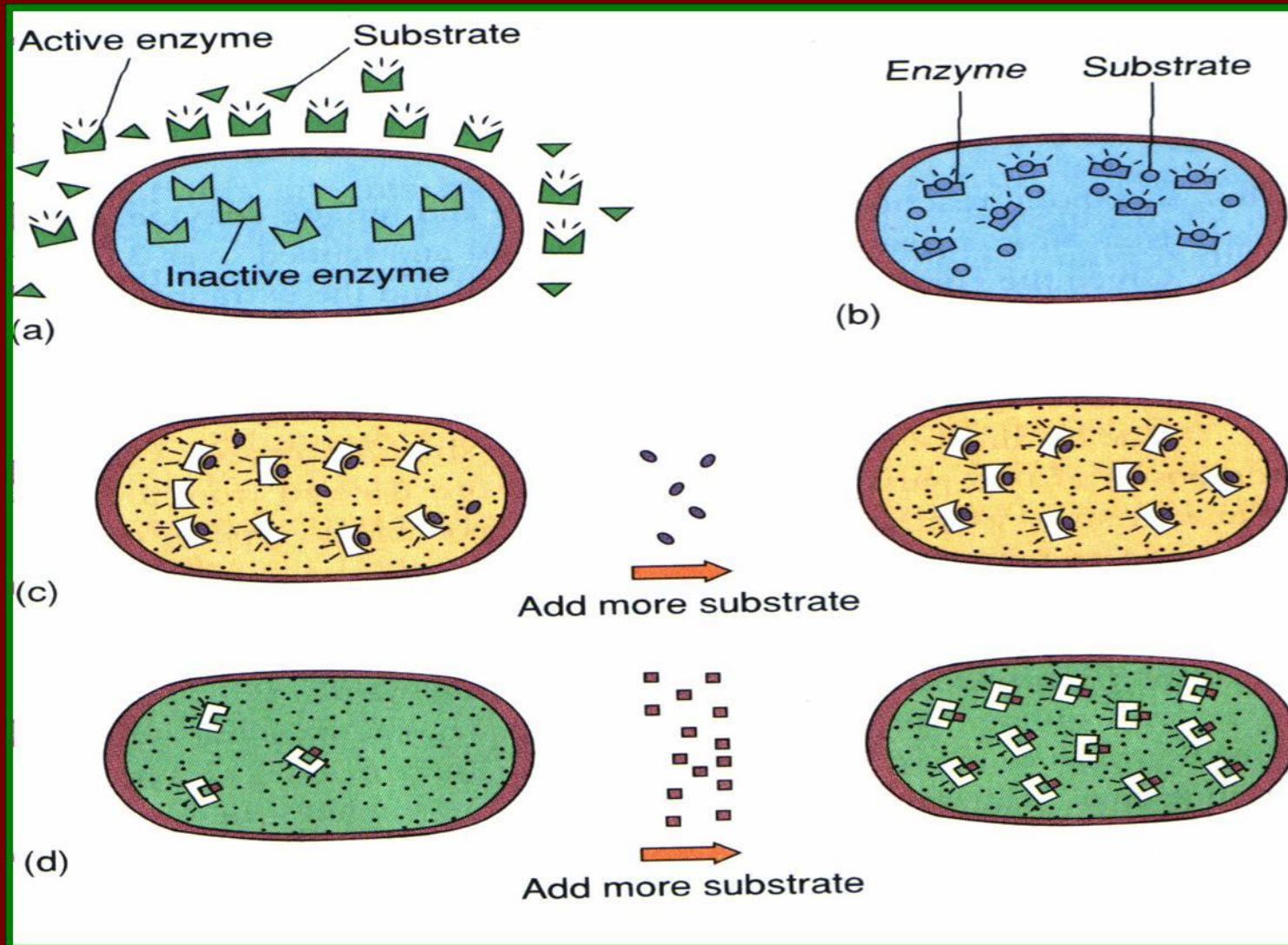
ЛИАЗЫ

ЛИГАЗЫ

ЭНДОФЕРМЕНТЫ

ЭКЗОФЕРМЕНТЫ

Ферменты бактерий



Значение ферментов

- Общебиологическое значение.
- Участие бактерий в круговороте веществ в природе, формировании месторождений полезных ископаемых (нефть, уголь, залежи серы).
- Микроорганизмы - прекрасные санитары окружающей среды. Они способны биodeградировать практически любые вещества, которые загрязняют окружающую среду.
- Их широко используют в разных отраслях химической, пищевой, фармацевтической, парфюмерной промышленности, сельском хозяйстве, медицине.

Протеазами удаляют волосяной покров из кожи животных, снимают желатиновый слой из киноплёнки.

Ферменты, которые обеспечивают брожение, используются для получения бутанола, ацетона, необходимых для проведения хроматографических исследований, этилового спирта, масляной кислоты.

Кисломолочные продукты - кефир, йогурт, простокваша, кумыс - также продукты деятельности бактерий брожения.

Микроорганизмы используются в виноделии, производстве пива, при изготовлении вершкового масла, силосовании кормов, квашении овощей.

Из дрожжей получают белково-кормовые добавки для выкармливания скота. Как питательную среду использует парафин - отходы нефти.

- С помощью микроорганизмов и их ферментных систем в медицинской промышленности получают гормоны гидрокортизон, преднизолон, многообразные алкалоиды.

- Пропионибактерии, актиномицеты синтезируют витамины (В12). Из стрептококков получен фибринолизин, стрептодорназу и стрептокиназу, которые разрушают тромбы в кровеносных сосудах.

Поскольку способность образовывать ферменты определенной специфичности присущая всем микроорганизмам, это широко используется в лабораторной практике для идентификации бактерий.

Энергетический метаболизм прокариотов.

За своим объемом реакции, которые обеспечивают клетку внутренней энергией, значительно превышают биосинтетические процессы.

Микроорганизмы могут использовать не все формы энергии, которые существуют в природе. Они способны пользоваться только энергией солнечного света (фотосинтезирующие бактерии) и химической (хемотрофные микробы). Недоступные для них ядерная, механическая и тепловая энергии.

Явление нагромождения энергии рассматривается как перенос ионов водорода путем отдельного транспорта протонов и электронов: протоны при этом выделяются в окружающую среду, а электроны передаются на соответствующие молекулы- акцепторы.

На протяжении своей эволюции бактерии произвели три способа получения энергии: брожение, дыхание и фотосинтез.

Окисление происходит в результате переноса электронов через специальную электроннотранспортную цепь, локализованную на мембране. Она состоит из набора переносчиков и в большинстве случаев влечет возобновление молекулярного кислорода к H_2O .

Основой фотосинтетических процессов у представителей микробного мира является поглощение солнечной энергии различными пигментами: флавопротеинами, хиноном, цитохромами и белками, которые содержат негеминное железо. Они и обеспечивают перенос электронов и, соответственно, высвобождение энергии.

Энергия, которую генерирует клетка, запасается в форме электрохимического трансмембранного градиента ионов водорода - H^+ или в молекулах АТФ.

На примере *E. coli* определено, сколько необходимо энергии, чтобы синтезировался 1 г клеточного вещества. Это нуждается в 37 ммоль АТФ, из них 20 ммоль используется на синтез белка, 7 ммоль - на синтез ДНК и РНК, 2 ммоль - для полимеризации сахаров. Остальные идут на поддержку жизнедеятельности - осмос, движение клетки и тому подобное.

Дыхание бактерий.

Это один из путей биологического окисления, который происходит с образованием молекул АТФ, то есть сопровождается накоплением энергии. Во время этого процесса одни вещества (органические и неорганические соединения) служат донорами электронов и при этом окисляются, акцепторами электронов выступают неорганические соединения, они возобновляются. У одних микроорганизмов конечным акцептором электронов выступает кислород, в других - неорганические сульфаты, нитраты, карбонаты.

Деление бактерий по типам дыхания

- **Облигатные аэробы** (возбудители туберкулеза, чумы, холеры)
- **Облигатные анаэробы** (возбудители столбняка, ботулизма, газовой анаэробной инфекции, бактероиды, фузобактерии)
- **Факультативные анаэробы** (стафилококки, ешерихии, сальмонелы, шигелы и другие)
- **Микроаэрофилы** (молочнокислые, азотфиксирующие бактерии)
- **Капнеичные** (возбудитель бруцеллеза бычьего типа)

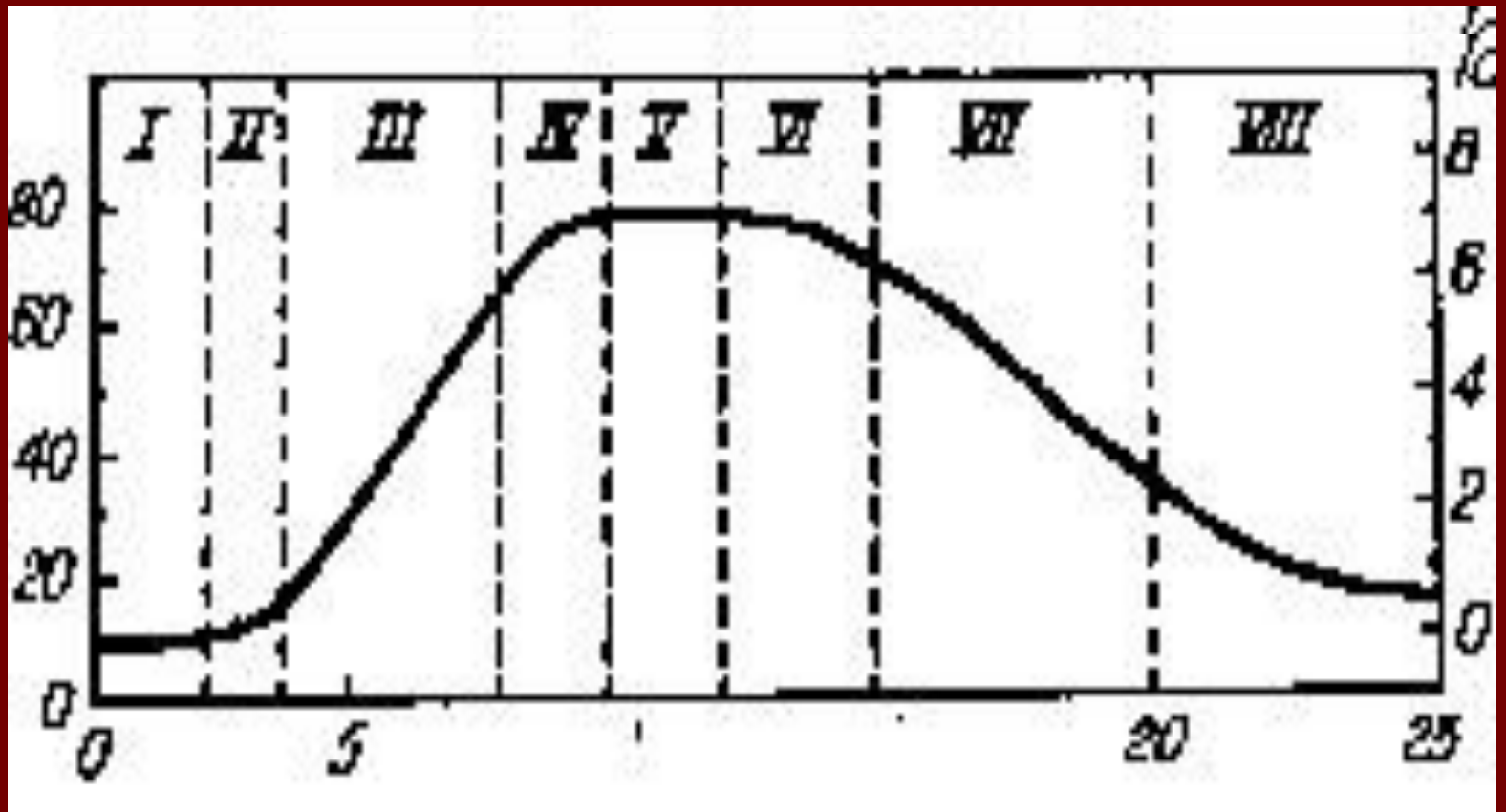
Под **ростом** понимают координированное воссоздание бактериальных структур и соответственно увеличение массы микробной клетки.

Размножение - это способность микробов к самовоспроизведению, при этом увеличивается количество особей в популяции на единицу объема среды

Бактерии размножаются в геометрической прогрессии. Если считать, что при оптимальных условиях бактерия удваивается каждые 30 минут, то через час их будет 4, через два часа - 16, через 4 - 256, через 15 - миллионы. Через 35 год их объем будет составлять до 1000 м³, а масса - свыше 400 т.

Кривая, которая описывает зависимость логарифма числа живых клеток от времени культивирования, называется кривой роста

Различают четыре основных фазы роста периодической культуры: начальную (или лаг-) фазу, экспоненциальную (или логарифмическую) фазу, стационарную и фазу отмирания



Время, на протяжении которого происходит деление микроба, называется **временами генерации**.

Начальная или фаза лага охватывает промежуток между инокуляцией бактерий и достижением наивысшей скорости их деления. В этот период происходит адаптация бактерий к условиям существования. В клетке в 8-12 раз растет количество РНК, увеличивается концентрация ферментов. Длительность фазы 1-2 год.

Экспоненциальная (логарифмическая) фаза характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток и роста их количества в геометрической прогрессии. Она зависит от возраста микробов и состава среды. Да, энтеробактерии делятся каждые 15-30 мин, стрептококки - 30 мин, а почвенные нитробактерии и возбудители туберкулеза - 5-18 час.

Время, на протяжении которого происходит деление микроба, называется **временами генерации**. Длительность фазы - 5-8 час

Стационарная фаза наступает тогда, когда число клеток перестает увеличиваться. Наступает равновесие между количеством живых микробов и тех, что отмирают. Этому способствует высокая плотность популяции, дефицит питательных веществ в среде, низкое парциальное давление кислорода, накопления токсичных продуктов обмена. Однако количество биомассы в этот период достигает наивысшего уровня, потому концентрацию клеток помечают как **максимальную (M-)** концентрацию, а величину биомассы - сроком **выход** или **урожай**. Этот признак является специфическим и характерным для каждого вида бактерий. Длится фаза 6-7 год.

Фаза отмирания (до 10 год) сопровождается резким уменьшением числа живых клеток. Этому способствуют значительный дефицит питательных веществ в среде, нагромождения кислот, автолиз под воздействием собственных ферментов.

Во многих случаях необходимо поддерживать клетки в фазе экспоненциального роста и **M-концентрации**, потому что именно в этот период они наиболее физиологически и функционально активные: синтезируют много белка, продуцируют большое количество многообразных ферментов, токсинов, антибиотиков, других биологически активных веществ. Это достигается постоянным удалением популяций бактерий, которые растут, обновлением питательной среды, дополнительной аэрацией (для аэробных бактерий). Именно по таким принципам работают **хеMOSTАТЫ** и **турбидостАТЫ** - приборы, которые позволяют проводить непрерывное культивирование в промышленных и лабораторных условиях.

Деление микроорганизмов за температурным оптимумом

Микроорганизмы	Температурный		
	оптимум	максимум	минимум
Термофилы	50-60 °C	75 °C	45 °C
Мезофилы	30-37 °C	43-45 °C	15-20 °C
Психрофилы	10-15 °C	25-30 °C	0-5 °C

Требования к питательным средам

1. Обеспечения потребностей в азоте, углероды и водород для построения собственных белков.

Водород и кислород для клеток поставляет вода.

Источником азота выступают многочисленные вещества, в основном, животного происхождения (мясо говяжье, рыба, мясо-костная мука, казеин), а также белковые гидролизаты, пептиды, пептоны.

2. Ростовые факторы (витамины, ферменты).

Универсальным источником их служат экстракты из белков животного и растительного происхождения, белковые гидролизаты. Для микробов с более сложными пищевыми потребностями в состав сред включают нативные субстраты - кровь, сыворотку, асцитическую жидкость, яичный желток, кусочки печени, почек, мозговой ткани и др.

3. Среды должны быть сбалансированными за микроэлементным составом и содержать ионы железа, меди, марганца, цинка, кальция, натрия, калию, иметь в своем составе неорганические фосфаты.

4. Допустимым является употребление веществ, которые устраняют действие ингибиторов роста и токсинообразования микробов (отдельные аминокислоты, твин, активированный уголь и тому подобное).

5. Стабилизация оптимума рН среды, его высокой буферности.

6. Среды должны иметь определенную вязкость, густоту

7. Изотоничность, прозрачность, обязательно стерильность

Классификация питательных сред

Простые	Сложные
Жидкие: ПВ, МПБ	Специальные: сахарный МПА, МПБ, сывор. МПА, кровь. МПА, асцит. МПА
Плотные: МПЖ, МПА	Обогащение, накопление: селенит МПБ с-ща Мюллера, Кауффмана, Китт-Тароцци
	Элективные: Ру, 1% щелочная ПВ
	Дифференциально-диагностические:
	1. для определения сахаролитических свойств (с-ща Гиса, Эндо, Левина, Плоскирева)
	2. для определения протеолитических свойств (свернутая сыворотка, МПЖ, кусочки мышц)
	3. для определения пептолитических свойств (МПБ, ПВ)
	4. для определения гемолитических свойств (кровь. МПА)
	5. для определения редуцирующих свойств (среды с разными красителями)

В зависимости от своей густоты, среды
разделяются на:

жидкие

полужидкие

плотные.

Среды разделяются на **естественные** и **искусственные**.

Как естественные используют свернутую сыворотку, молоко, яйца, мускульную ткань. Искусственные среды создают путем комбинирования многообразных субстратов, которые обеспечивают те или другие потребности микроорганизмов.

В зависимости от потребностей бактериологов существующие питательные среды разделяются на четыре основных группы

Первая группа - универсальные (простые) среды.

К ним принадлежат простые среды: мясо-пептонный бульон (МПБ) и мясо-пептонный агар (МПА).

За своим составом, наличием питательных веществ они пригодны для культивирования многих видов бактерий.

Вторая группа - **специальные среды.**

Они используются в тех случаях, когда микроорганизмы не растут на простых. К ним принадлежит кровяной, сывороточный агары, сывороточный бульон, асцитический бульон и асцитагар.

Третья группа - **элективные среды**.

Их используют для целеустремленного выделения и накопления бактерий из материала, который содержит много посторонних микробов.

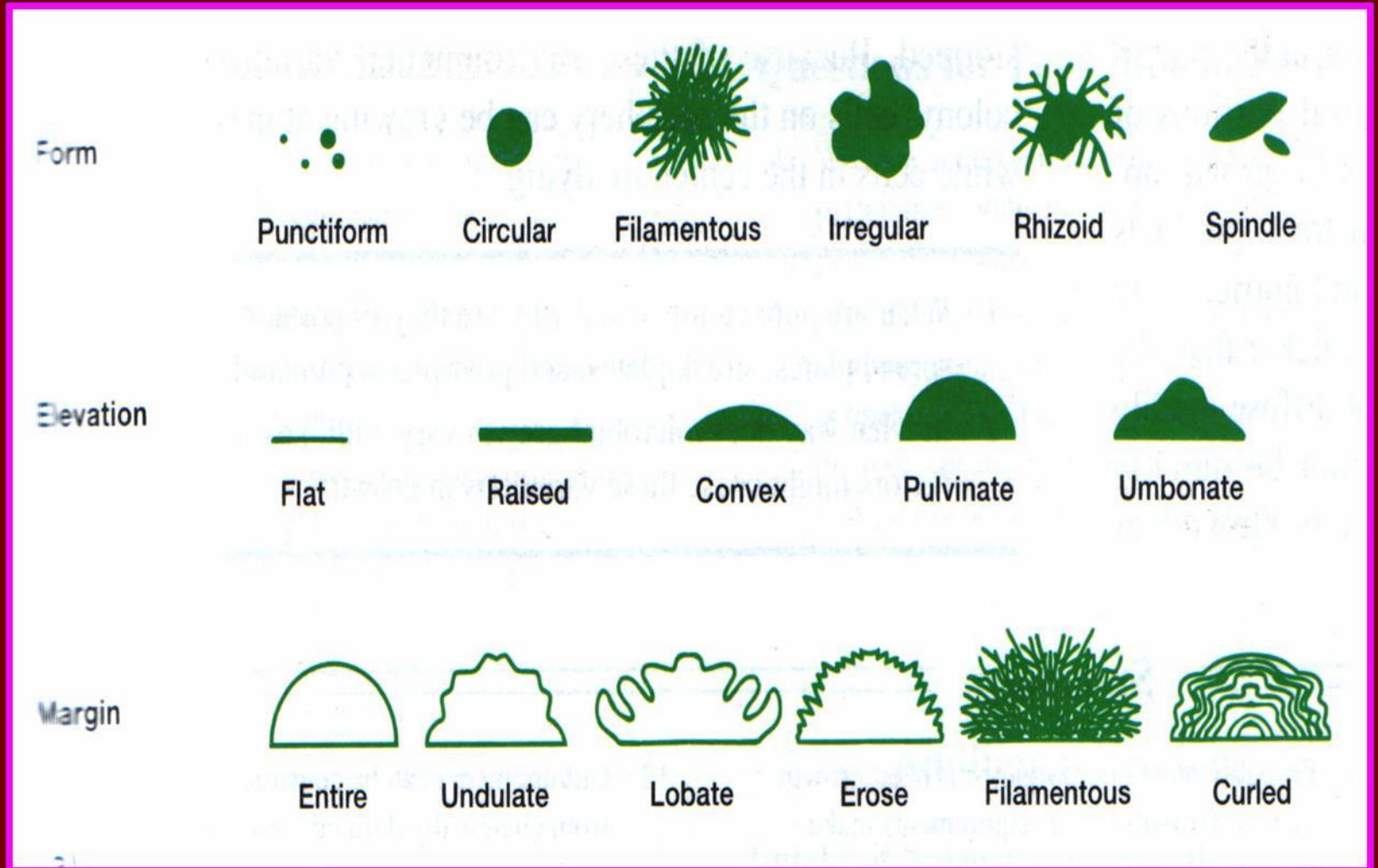
Создавая такие среды, учитывают биологические особенности бактерий определенного вида, которые отличают их от других.

Элективным для холерных вибрионов есть 1 % щелочная пептонная вода, среды Ру и Леффлера - для возбудителей дифтерии, среда Плоскирева - для дизентерийных палочек, среда Мюллера- для тифо-паратифозных бактерий. Красивый рост стафилококков наблюдается на средах, в составе которых есть до 10 % хлорида натрия. Микрококки и коринебактерии растут на агаре, что содержит фуразолидон.

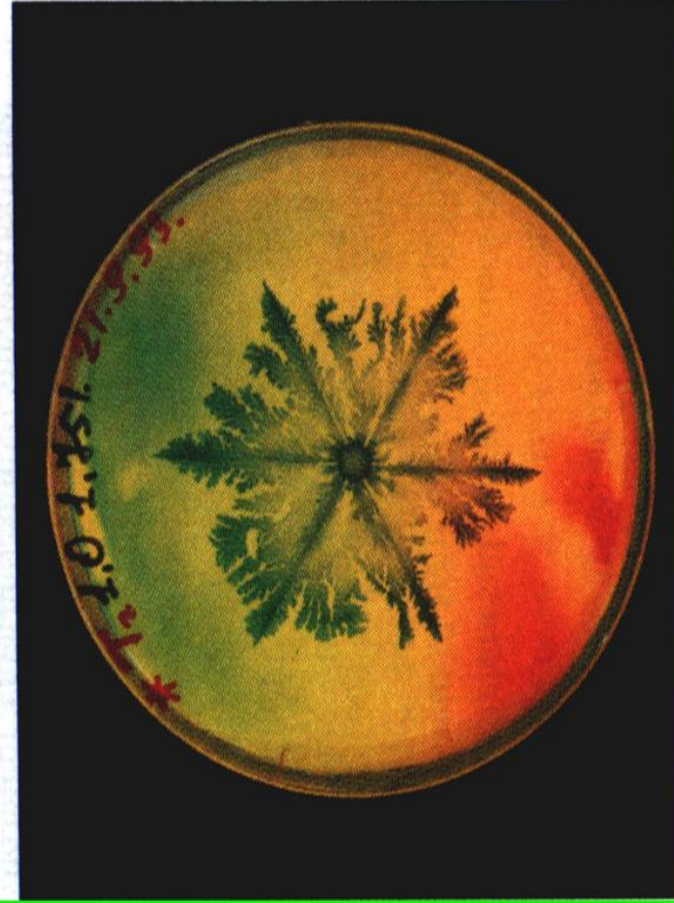
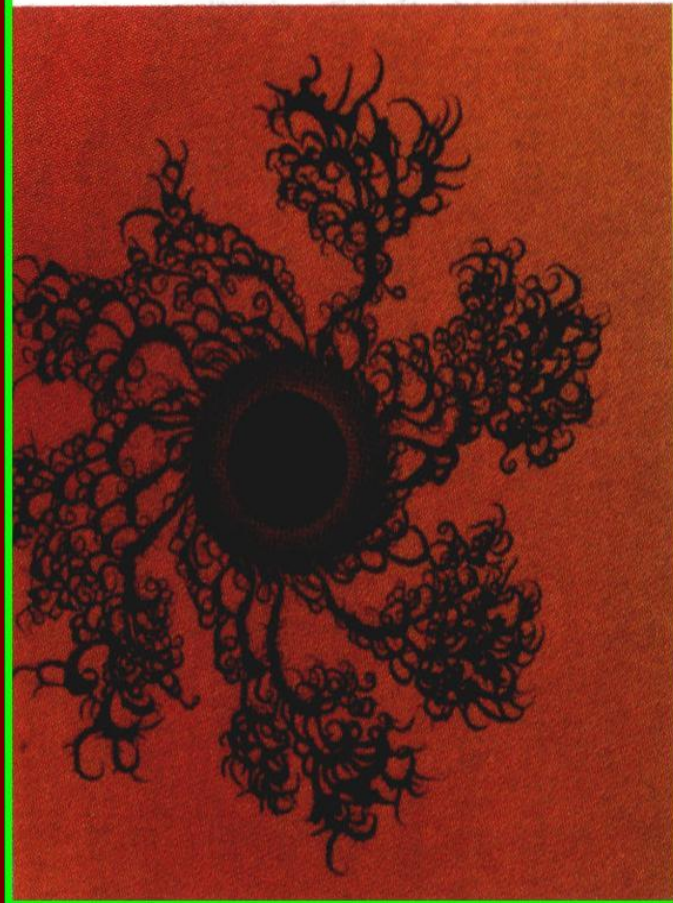
Четвертая группа - дифференциально-диагностические среды.

Это большая группа сред, которые позволяют определить определенные биохимические свойства микроорганизмов и проводить их первичную дифференциацию. Они разделяются на среды для определения протеолитических, пептолитических, цукролитических, гемолитических, липолитических, редуцирующих свойств и тому подобное.

Многообразие форм и поверхности колоний



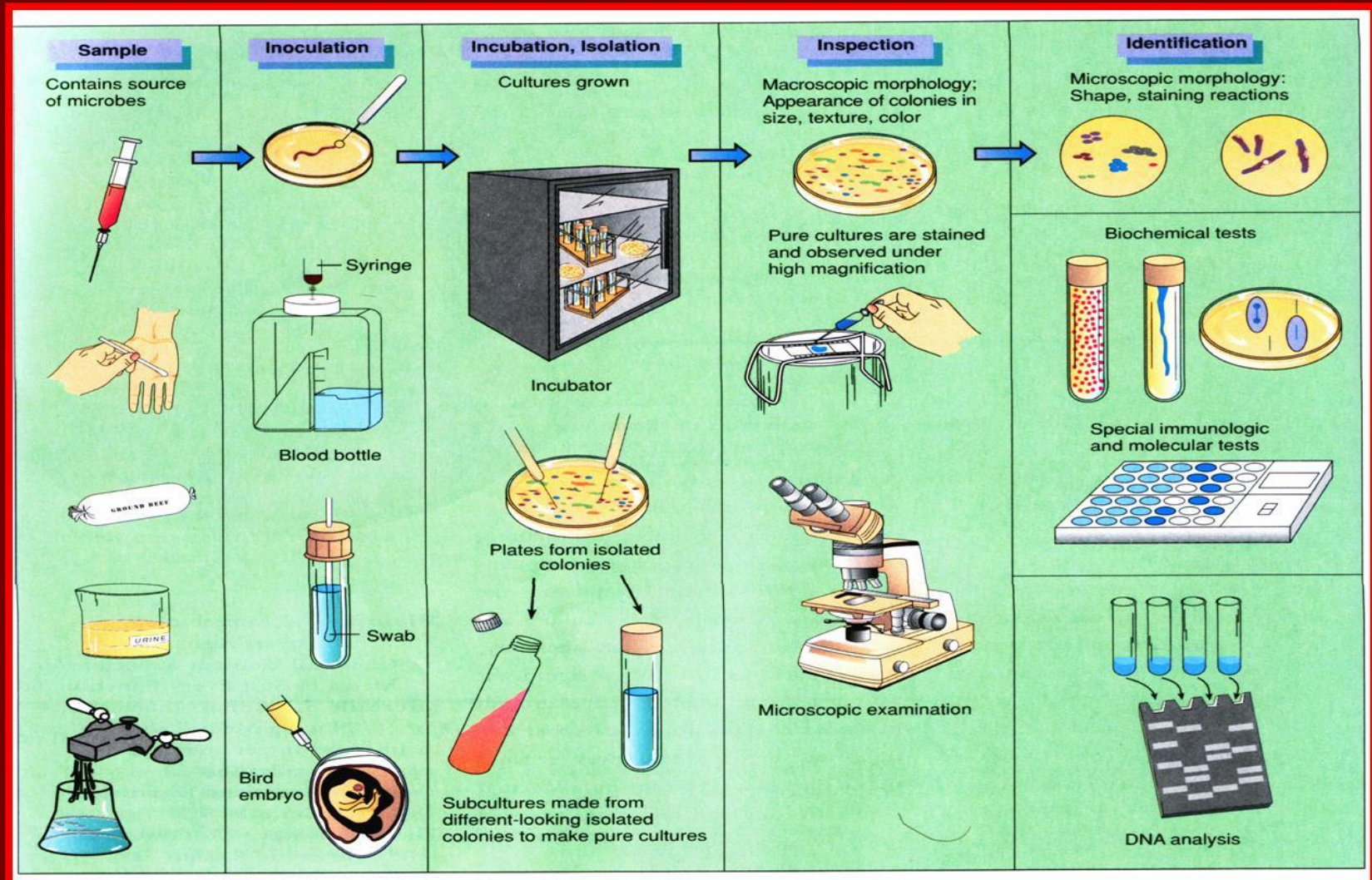
Разные виды поверхности бактериальных колоний



Этапы выделения чистых культур аэробных микроорганизмов:

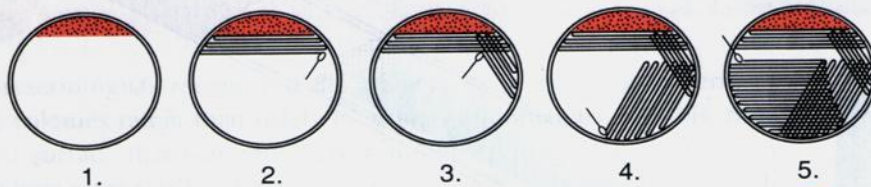
- **1** - макро- и микроскопическое изучение исследуемого материала и заныл на плотные питательные среды для получения отдельных колоний;
- **2** - макро- и микроскопическое изучение колоний и пересевание на скошенный агар;
- **3** - проверка чистоты выделенной культуры и ее идентификация;
- **4** - вывод о выделенной культуре.

Этапы выделения чистой культуры бактерий



Методы получения изолированных колоний

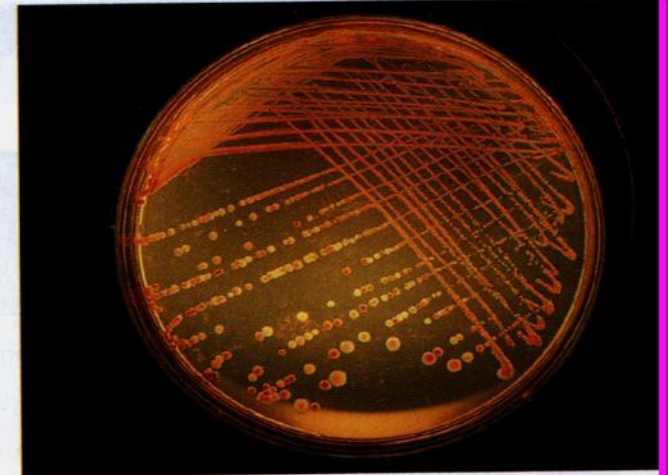
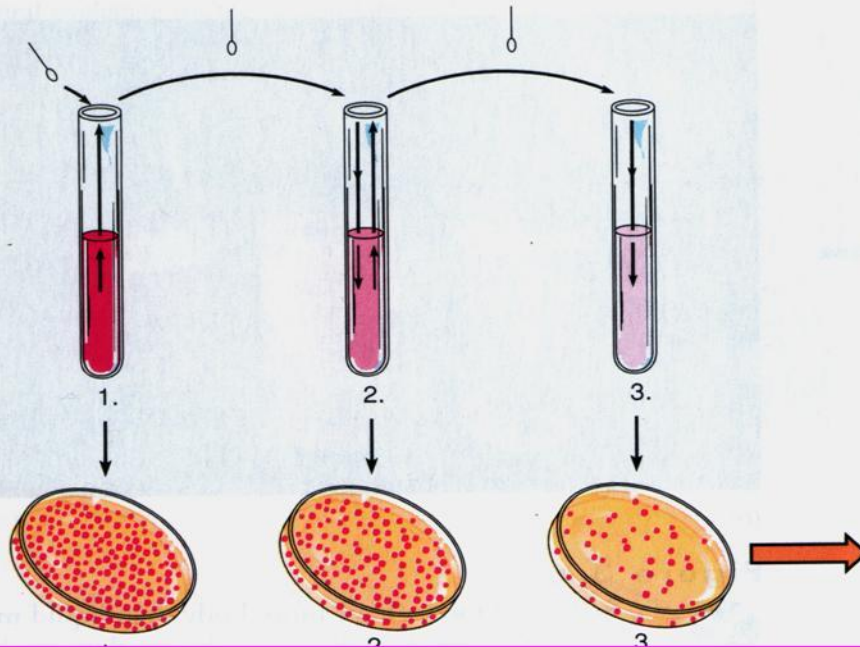
Steps in a Streak Plate



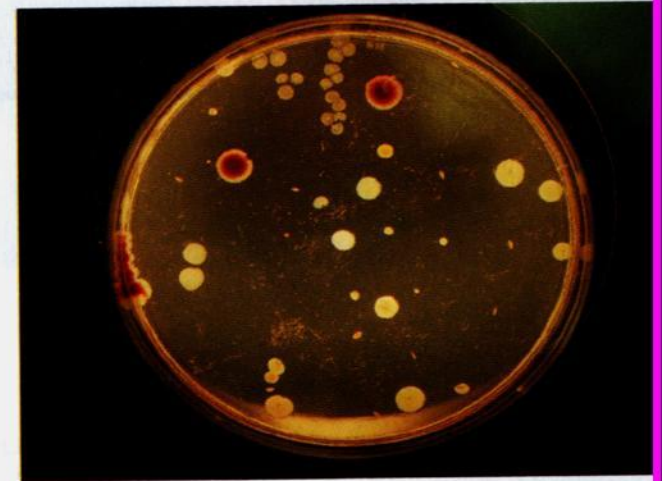
(a)



Steps in Loop Dilution



(b)



Биохимические свойства бактерий

