

Физиология микроорганизмов

Зав.кафедрой
д.м.н., профессор
Г.И.Чубенко



Химический состав бактерий.

Вода основной компонент бактериальной клетки, она находится в свободном и связанном состоянии.

- Гидролитические процессы расщепления белков, углеводов и липидов происходят в результате присоединения к ним воды.
- При недостатке воды нарушается и размножение бактерий.
- Связанная вода определяет устойчивость к физическим факторам

Химический состав

Вода
(75-85%)

СВОБОДНАЯ
участвует в химических реакциях, служит растворителем для различных соединений, образующихся в клетке в процессе обмена веществ

СВЯЗАННАЯ
входит в состав коллоидов клетки (белки, полисахариды и др.) и с трудом высвобождается из них

Сухое вещество
(15-25%)

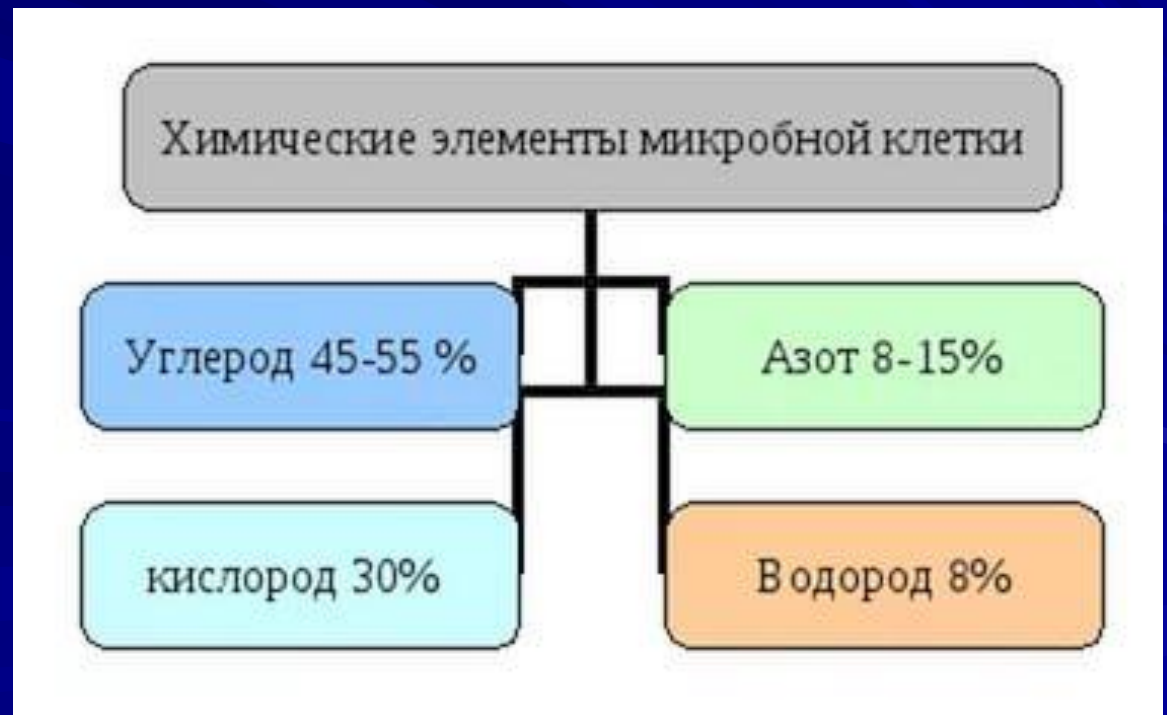
МИНЕРАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА
2-14% (зольные)
фосфор, калий, сера, магний, кальций

ОРГАНИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА
86-98%

- белки (52%)
- полисахариды (17%)
- нуклеиновые кислоты РНК (16%), ДНК (3%)
- липиды (9%)

В микробной клетке содержатся

углерод (45%), азот (8-15%), кислород (30%), водород (6-8%) и минеральные вещества от 3 до 10 % (фосфор, сера, магний, железо, кальций, калий, цинк, кобальт, медь и др.), Вода.



Химические элементы клетки

макро элементы

98% массы
клетки

C O N H

мезо элементы

1,9% массы
клетки

P S K Ca Na
Mg Fe Cl

микро элементы

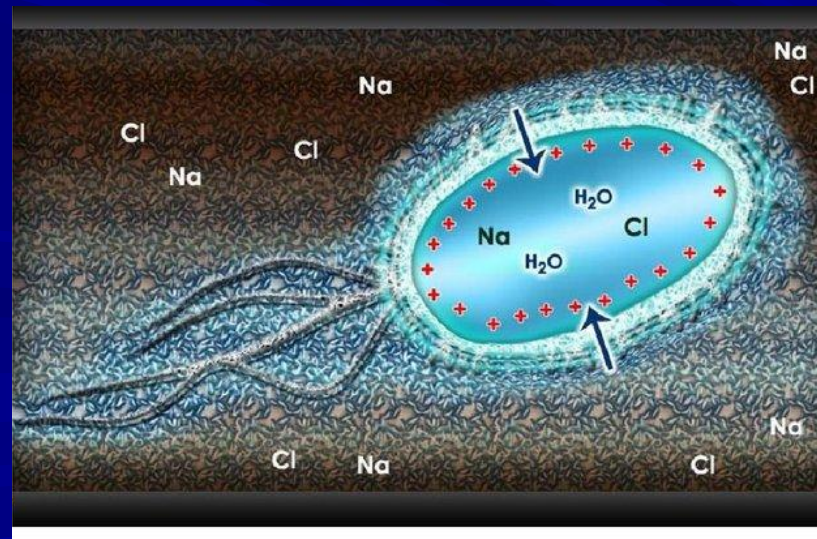
0,1% массы
клетки

I Zn Cu F Mn

www.bionet.ru

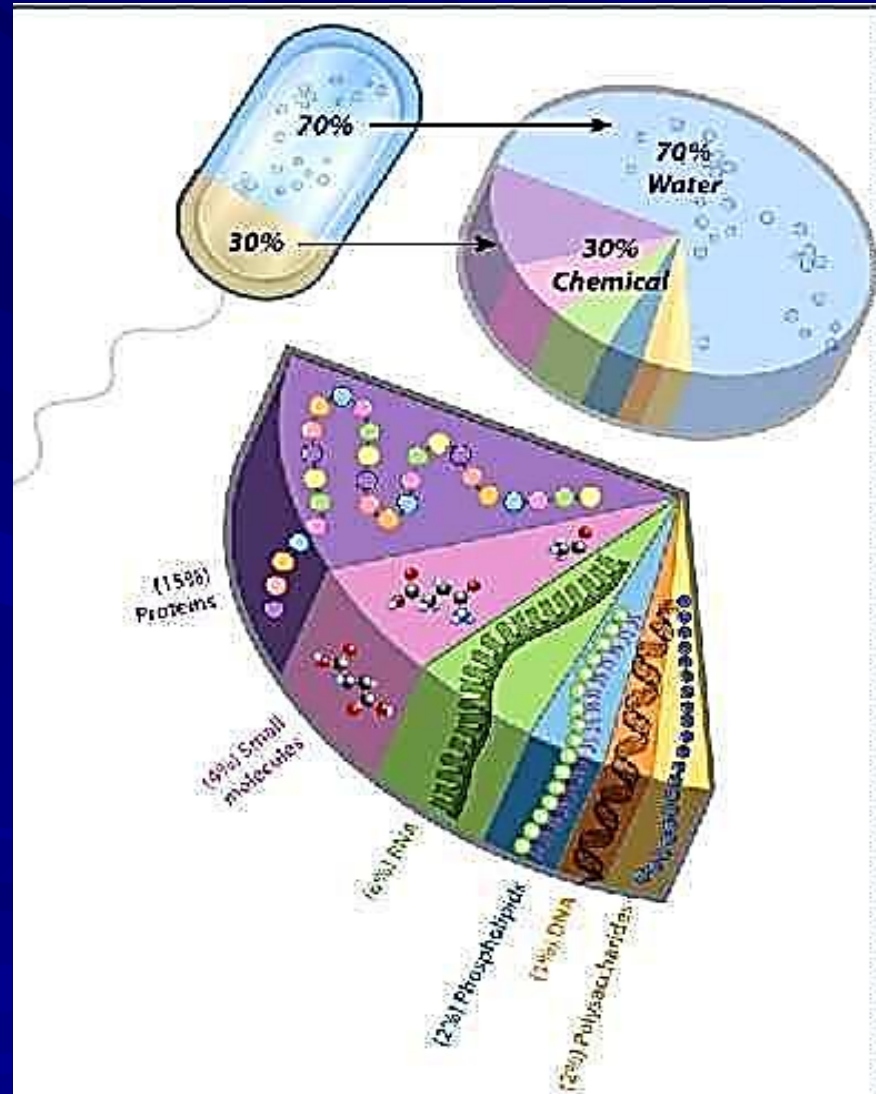
Минеральные вещества

- стимулируют процессы роста и размножения бактерий,
- определяют рН среды,
- окислительно-восстановительный потенциал,
- поддерживают осмотическое давление,
- активность ферментативных процессов.



В составе бактерий имеются

- белки,
- углеводы,
- липиды,
- ВИТАМИНЫ.



Белки

В состав белков прокариот входят 20 аминокислот.

- Белки входят в состав различных морфологических структур,
- являются составными частями ферментов, токсинов, антигенов,
- определяют отношение к красителям, лекарственным и дезинфицирующим веществам.

Они могут быть простыми и сложными

Простые белки при гидролизе распадаются на аминокислоты (лейцин, триптофан и др.).

Сложные белки (протеиды)- это соединения простых белков с небелковыми группами: нуклеиновыми кислотами, полисахаридами, липидами и др.

Углеводы (12-18%) массы бактерий

Представлены:

- многоатомными спиртами (сорбит, дульцит, манит);
- полисахаридами (гексозы, пентозы, гликоген, декстрин);
- моносахаридами (глюкоза, глюкуроновая кислота и др.)

Углеводы выполняют главную энергетическую функцию и определяют антигенную специфичность микроорганизмов.

УГЛЕВОДЫ

Представлены в виде:

моносахаров

дисахаров

олигосахаров

полисахаров

Находятся в составе комплексных соединений:

белками

липидами

другими соединениями

Липиды

Липиды (истинные жиры) встречаются у риккетсий, дрожжей, микобактерий, грибов и др.

Бактериальные липиды играют роль резервных веществ.

Представлены свободными жирными кислотами, нейтральными жирами, восками, фосфолипидами.

- Могут быть использованы как исходные компоненты для синтеза белков.
- Входят в состав основной токсической фракции многих микроорганизмов.
- Определяют проницаемость клеточных мембран, их стабильность
- устойчивость к кислотам и щелочам, заряд клетки.

Метаболизм

- совокупность ферментативных реакций направленных на получение энергии и превращение простых соединений в макромолекулы.
- совокупность двух противоположных процессов: катаболизма (энергетического метаболизма) анаболизма (пластического, конструктивного метаболизма).

Питательные вещества, поступающие в клетку, служат источником энергии и строительным материалом для синтеза клеточных структур.



Особенность метаболизма бактерий

- Большая площадь поверхности при малом объеме клетки
- Высокая интенсивность метаболизма
- Огромная ферментативная насыщенность
- Высокая проницаемость клеточной стенки и ЦПМ
- Внеклеточное расщепление субстрата

Конструктивный метаболизм (анаболизм)

- Поток реакций, в результате которых за счет поступающих извне веществ строится вещество клетки, сопровождается потреблением свободной энергии, запасенной в макроэргах.
- В процессе анаболических реакций эта энергия расходуется на синтез многочисленных макромолекул органических соединений.



Питание (бактерий)

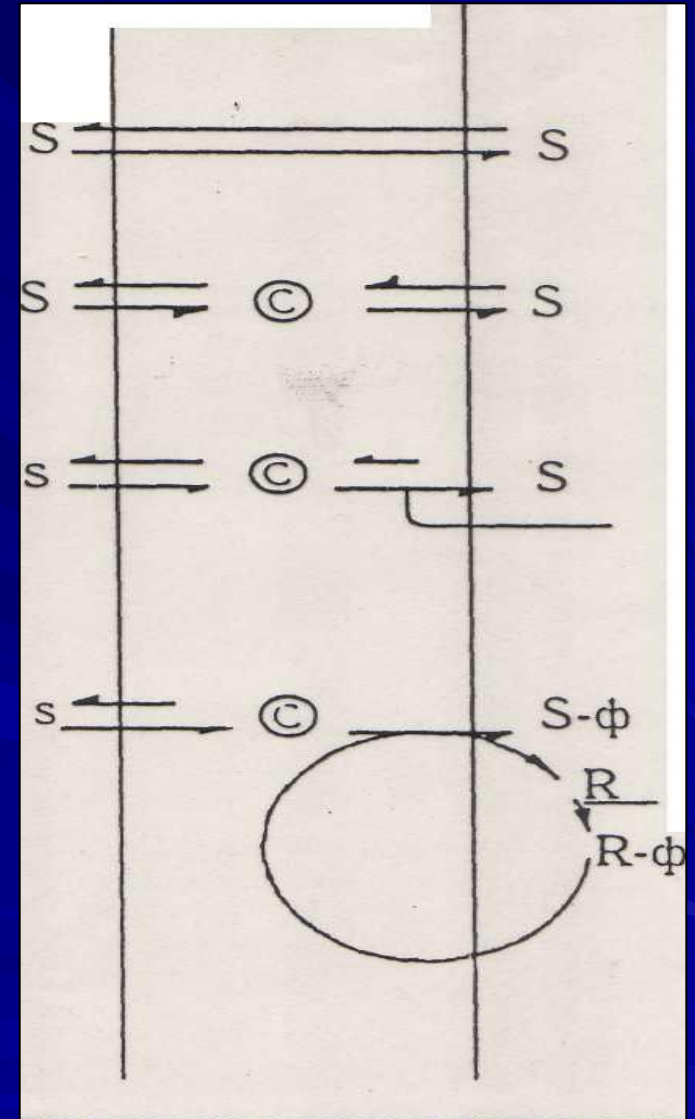
По способу питания бактерии относятся к голофитным объектам (нет специализированных органов для принятия пищи).

Особенности питания бактерий:

- питательные вещества поступают через всю поверхность микробной клетки в растворенном виде.
- высокая пластичность к меняющимся условиям окружающей среды.

Механизмы питания у бактерий

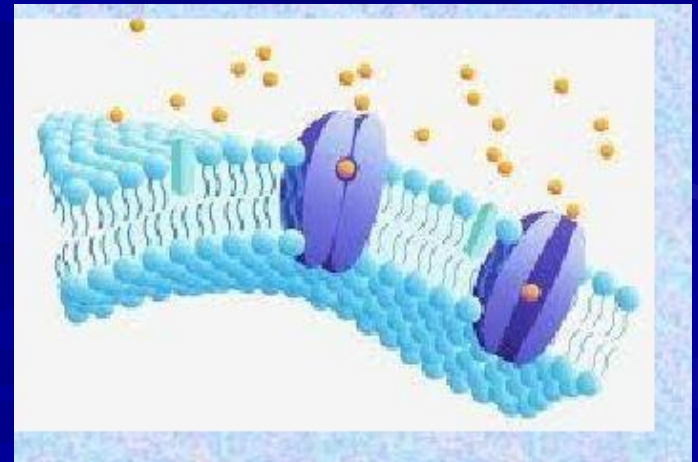
- Пассивная диффузия (по градиенту концентрации)
- Облегченная диффузия (посредством системы транслоказ и пермеаз по градиенту концентрации)
- Активный транспорт (против градиента концентрации с помощью переносчиков и с затратами энергии)
- Транслокация (модификация химического вещества) с затратами энергии



Пермеазы катализируют присоединение вещества-субстрата к активному центру на своей поверхности и проводят это вещество с наружной поверхности ЦПМ на внутреннюю.

Здесь пермеаза освобождается от вещества, а сама вновь вступает во взаимодействие с новой порцией субстрата.

Пермеазы составляют значительную часть белков ЦПМ.

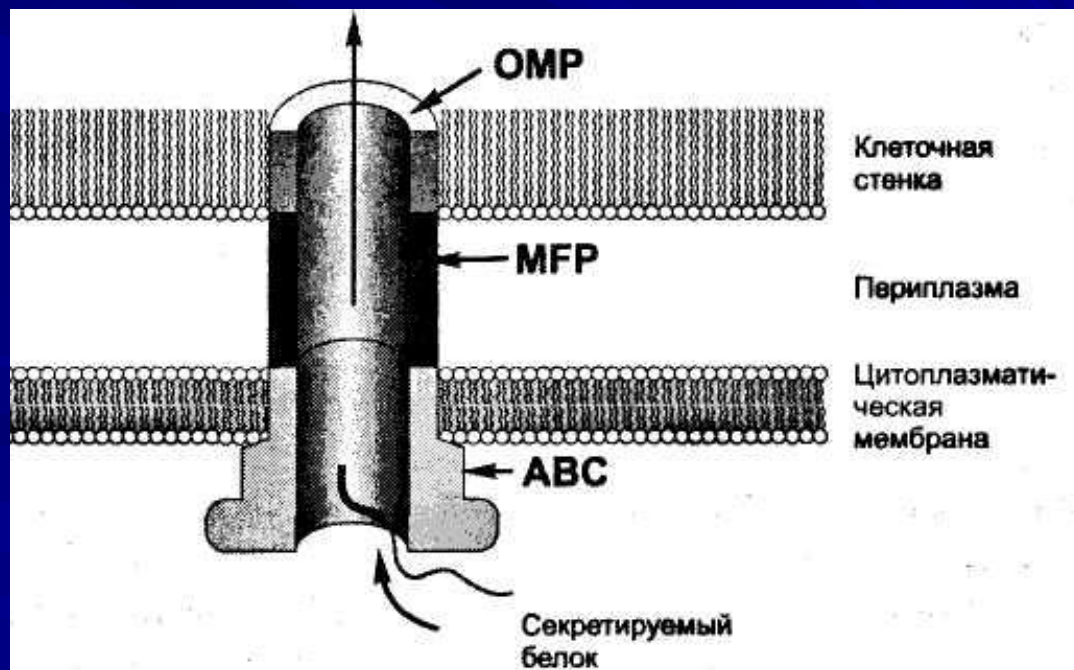


Типы секреции:

I тип секреции

Требует наличия 3 белков:

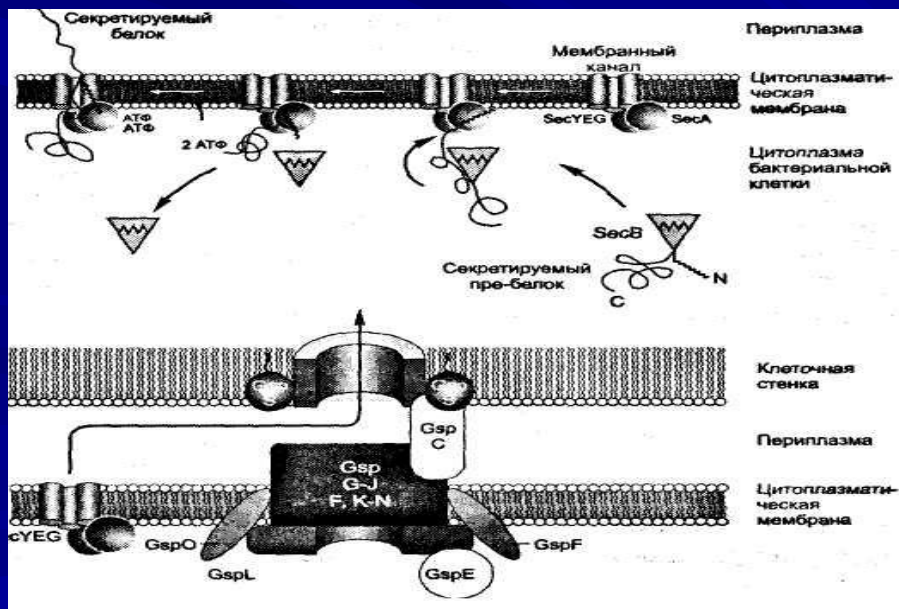
- Транспортной аденозинфосфатазы ЦПМ;
- Белка ЦПМ, формирующего канал в периплазме;
- Белка-секретина, образующего канал в пептидогликане.



II тип секреции «общий секреторный путь» (GSP).

Секреторный аппарат формирует 12-14 белков, основная часть которых расположена в ЦПМ.

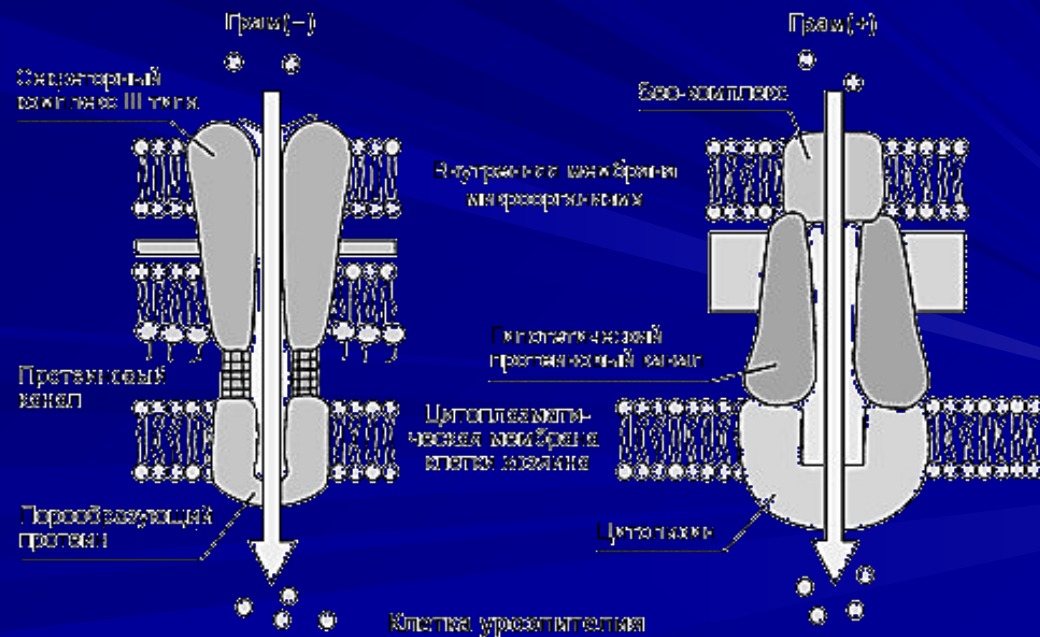
Секретируемые белки первоначально накапливаются в периплазме, где формируют молекулы четвертичной структуры, а затем происходит их удаление через канал, образованный в клеточной стенке белком секретинном.



III тип секреции

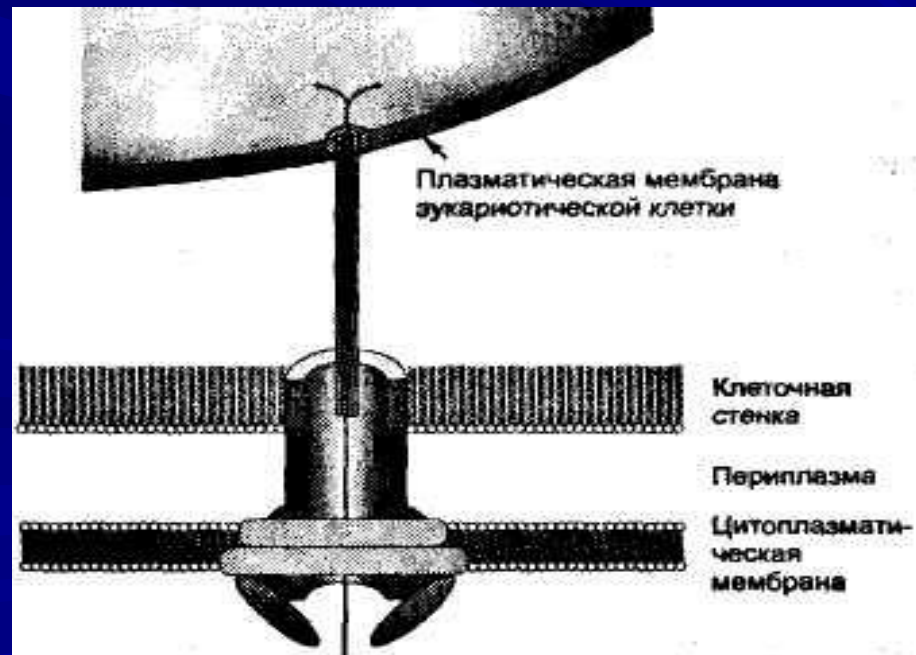
Обеспечивает не только перенос секреторных продуктов через мембранные структуры бактериальной клетки, но и доставку их внутрь эукариотических клеток.

Структурно представляет собой «молекулярный шприц», образованный двадцатью белками, преимущественно расположенными в ЦПМ.

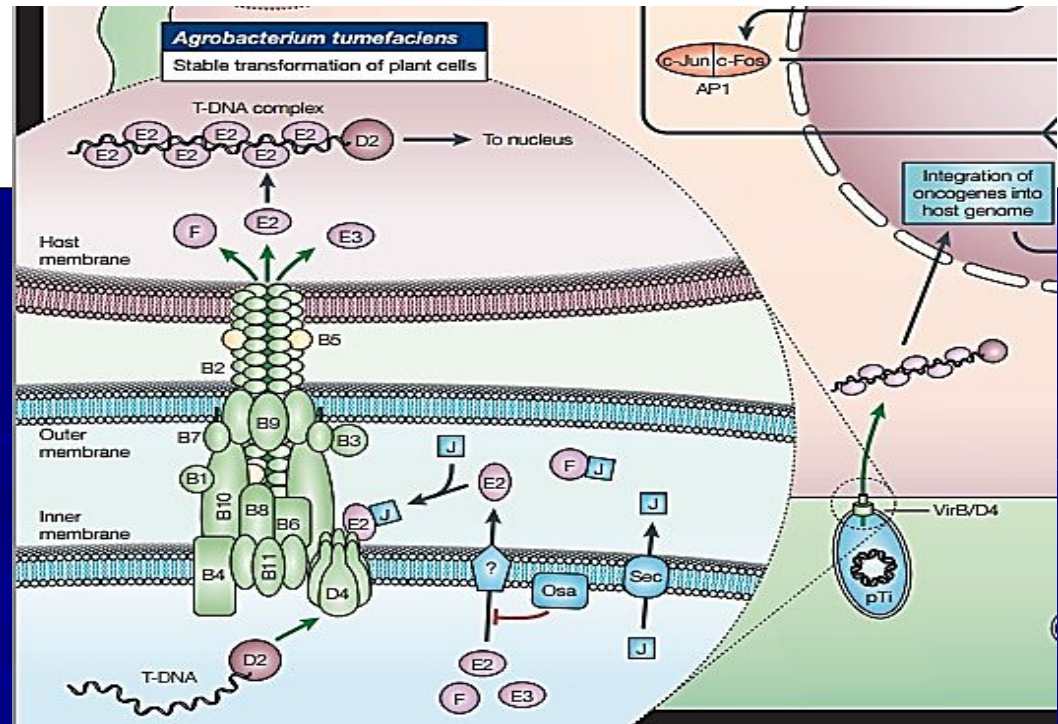


Транспортируемые молекулы находятся в интактной форме и активируются только после попадания в цитоплазму эукариотической клетки-мишени.

Кроме интегральных мембранных белков в состав аппарата секреции входит и несколько цитоплазматических белков, участвующих в доставке секреторных продуктов к локусу секреции.



IV тип секреции



V тип секреции

Отличается от II типа тем, что в периплазматическом пространстве из С-терминальной части секретируемого полипептида формируется бета-цилиндрическая структура, выполняющая роль поры, через которую проходит N-терминальный конец.

Внеклеточный протеолиз приводит секретируемый белок в активное функциональное состояние.

Типы питания

В зависимости от источников углерода микроорганизмы делятся:

- Автотрофы- синтезируют все компоненты из неорганического углерода (CO_2)и воды
- Гетеротрофы- источник углерода органические соединения



Строгие (облигатные) паразиты- живут только внутри клетки-хозяина;

- Факультативные паразиты- существуют как внутри, так и вне клетки-хозяина;
- Сапрофиты – используют органические остатки (растений и животных);



В зависимости от источников азота

микроорганизмы делятся:

- Прототрофы- способны синтезировать азотсодержащие соединения из солей аммония, нитратов, нитритов и глюкозы.
- Ауксотрофы- ассимилируют только готовые азотсодержащие органические соединения

Факторы роста микроорганизмов

- макроэлементы (Ca, Mg, Fe, K, Mn)
- микроэлементы (Co, Ni, Cu, Zn, Mo и др.)
- Пурины и пиримидины
- витамины



Синтез углеводов

Углеводы представлены в виде моно-, ди-, полисахаридов, а также комплексных соединений

Автотрофы синтезируют углеводы в реакциях восстановления пентозофосфатного цикла

Гетеротрофы - в гликолитическом пути и путем глюконеогенеза (из неуглеводных предшественников)

Обмен углеводов у микроорганизмов

Схема 1

Автотрофы

Гетеротрофы

CO₂ Цикл Кальвина

C₂-C₃-соединения

Полисахара

Рибулозофосфат-
фосфорно-глицериновая
кислота

Реакции гликолиза,
идущие в обратном
направлении

Дисахара

Моносахара

Глюкоза

глюкоза

Взаимопревращение сахаров

фруктоза,
лактоза и др.

Глюкозофосфат+УДФ

УДФ-глюкоза

Различные сахара

Получение аминокислот прокариотами

Осуществляется из:

- Пирувата, альфакетоглутората, фумарата (из цикла трикарбоновых кислот) в реакциях аминирования (ионами NH_4) и переаминирования;
- Из молекул белка (протеазы, пептидазы);
- В готовом виде из клетки-хозяина

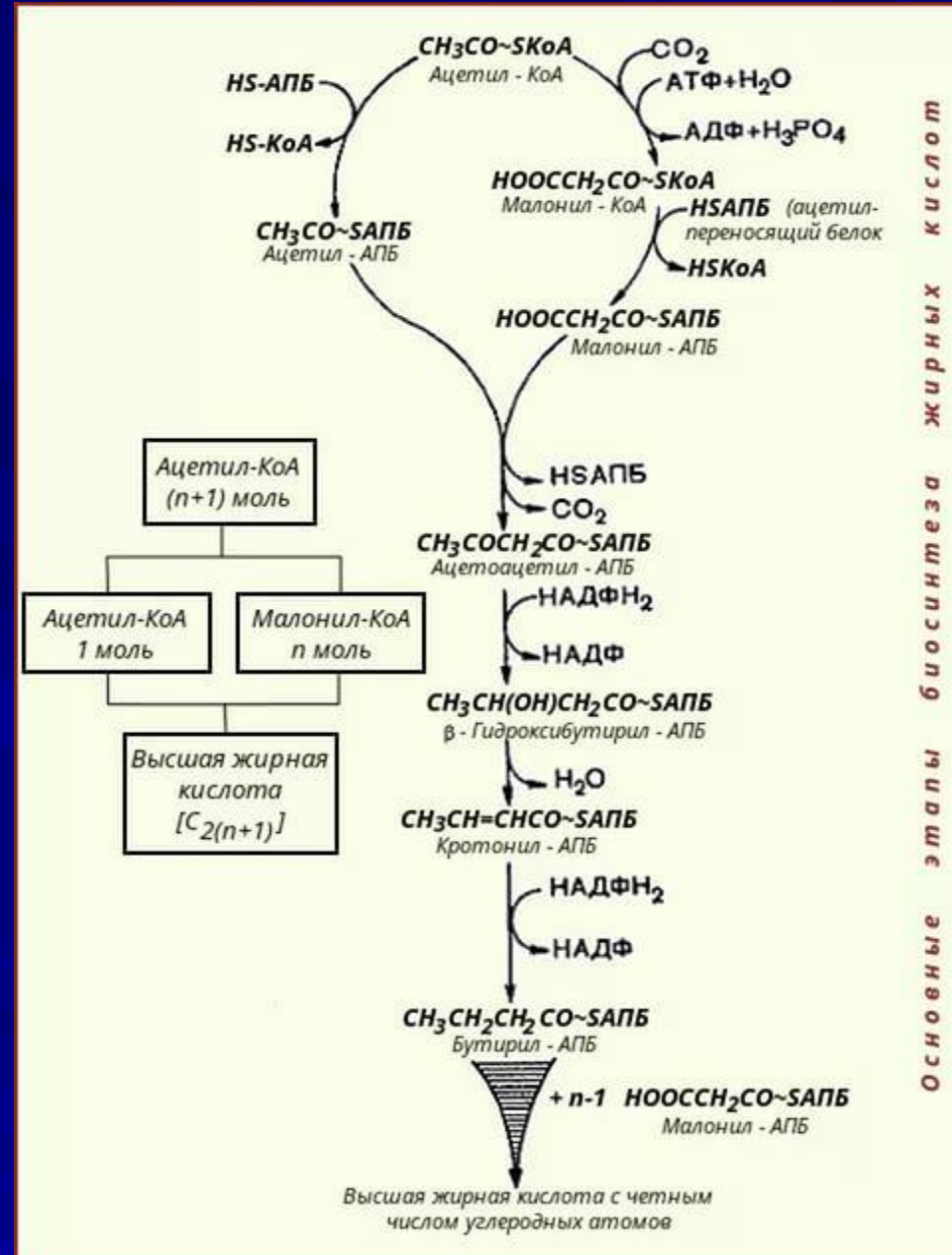
Некоторые особенности биосинтеза аминокислот

Предшественник	Метаболический путь, приводящий к образованию предшественника	Аминокислоты с общими биосинтетическими путями
Щавелевоуксусная кислота	цикл трикарбоновых кислот реакции карбоксилирования	аспарагиновая кислота аспарагин лизин метионин треонин изолейцин
α -Кетоглутаровая кислота	цикл трикарбоновых кислот	глутаминовая кислота глутамин аргинин пролин
3-Фосфоглицериновая кислота	гликолиз цикл Кальвина	серин глицин цистеин
Пировиноградная кислота	гликолиз путь Энтнера — Дудорова	аланин валин лейцин
Фосфоенолпировиноградная кислота + Эритрозо-4-фосфат	гликолиз окислительный пентозофосфатный путь	триптофан тирозин фенилаланин
5-Фосфорибозил-1-пирофосфат + АТФ	окислительный пентозофосфатный путь	гистидин

Синтез липидов

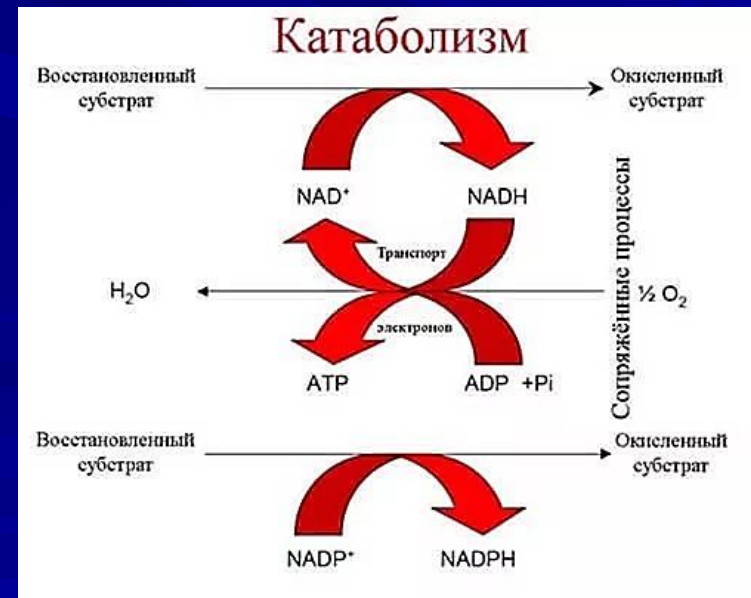
У бактерий преобладают длинноцепочечные (C14-C18) насыщенные жирные кислоты и ненасыщенные жирные кислоты с одной двойной связью.

Из промежуточных продуктов: ацетилкоэнзима А и диоксиацетилфосфата.



Энергетический метаболизм (катаболизм)

- Поток химических реакций, сопровождающийся мобилизацией энергии и преобразованием ее в форму, которая затем может использоваться во всех энергозависимых процессах.
- В процессе катаболических реакций происходит выделение энергии, которая накапливается в молекулах макроэрга.



Этапы катаболизма (схема)



В зависимости от источников энергии

Микроорганизмы делятся:

- Фототрофы- способные использовать энергию света (фотосинтезирующие)
- Хемотрофы- получают энергию за счет окислительных и восстановительных реакций

В зависимости от природы доноров электронов

Микроорганизмы делятся:

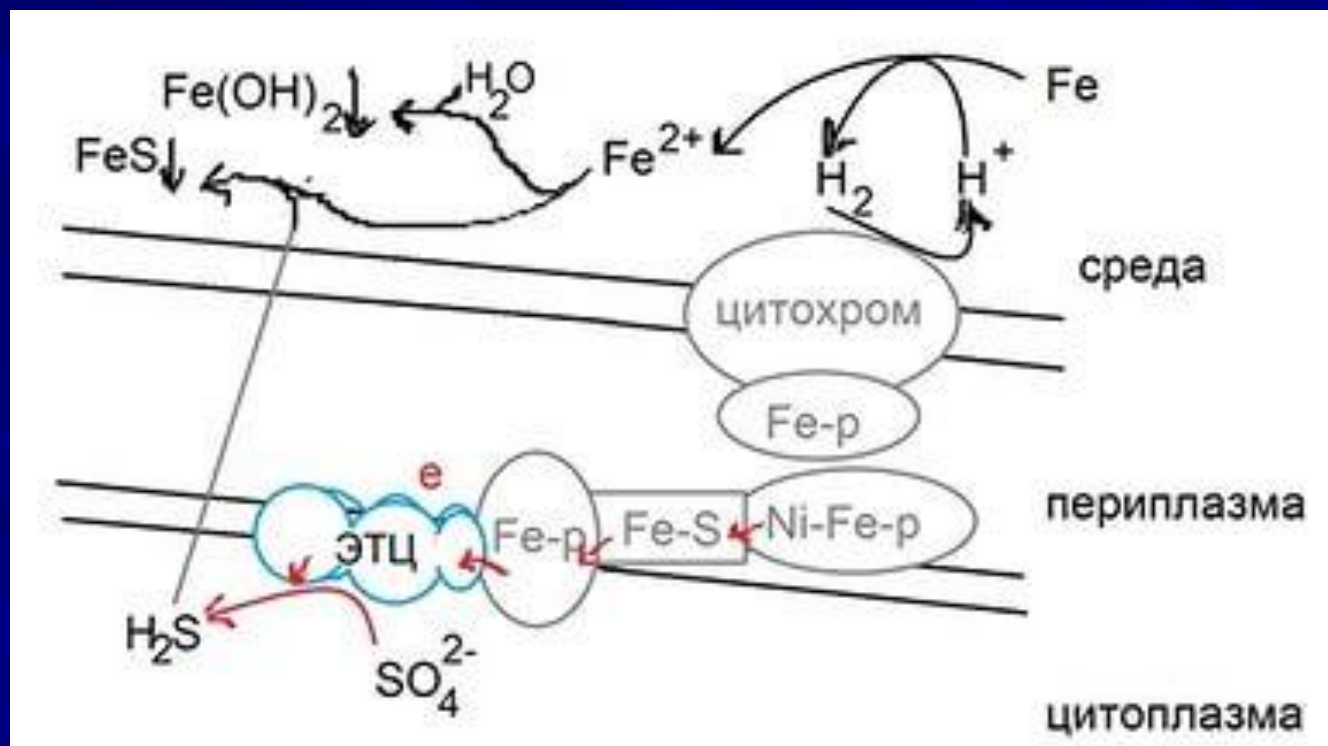
- Хемолитотрофы (хемоавтотрофы)- H_2 , Fe, NH_3 , CH_3 и др.
- Хемоорганотрофы (хемотретотрофы)-органические соединения.

Большинство прокариот являются хемоорганотетотрофами.

Источник энергии	Донор электронов	Источник углерода	Способ существования	Представители прокариот
Окислительно-восстановительные реакции	неорганические соединения (H_2 , H_2S , NH_3 , Fe^{2+} и др.)	CO_2	хемотритоавтотрофия	нитрифицирующие, тионовые, водородные бактерии; ацидофильные железобактерии
		органические соединения	хемотритогетеротрофия	метанобразующие архебактерии, водородные бактерии
	органические соединения	CO_2	хемотритоавтотрофия	факультативные метилотрофы, окисляющие муравьиную кислоту
		органические соединения	хемотритогетеротрофия	большинство прокариот*
Свет	неорганические соединения (H_2O , H_2S , S^0 и др.)	CO_2	фотолитоавтотрофия	цианобактерии, пурпурные и зеленые бактерии**
		органические соединения	фотолитогетеротрофия	некоторые цианобактерии, пурпурные и зеленые бактерии
	органические соединения	CO_2	фотоорганотрофия	некоторые пурпурные бактерии
		органические соединения	фотоорганогетеротрофия	пурпурные и некоторые зеленые бактерии, галобактерии, некоторые цианобактерии

Механизмы получения энергии у бактерий:

- Окислительный метаболизм (дыхание);
- Бродильный (ферментативный) метаболизм
- Смешанный метаболизм
- фотосинтез



При окислительном метаболизме

Энергия образуется в реакциях окисления-восстановления, при которых донорами электронов могут быть органические и неорганические соединения, а акцептором- только молекулярный кислород.

	Ферментативное поглощение O ₂ (дыхание)		
Неферментативное окисление	свободное окисление	окисление, сопряженное с запасанием энергии	
		нефосфорилирующее	фосфорилирующее

- Окисление происходит в результате переноса электронов через локализованную в мембране дыхательную электрон-транспортную цепь (мембранное фосфорилирование).

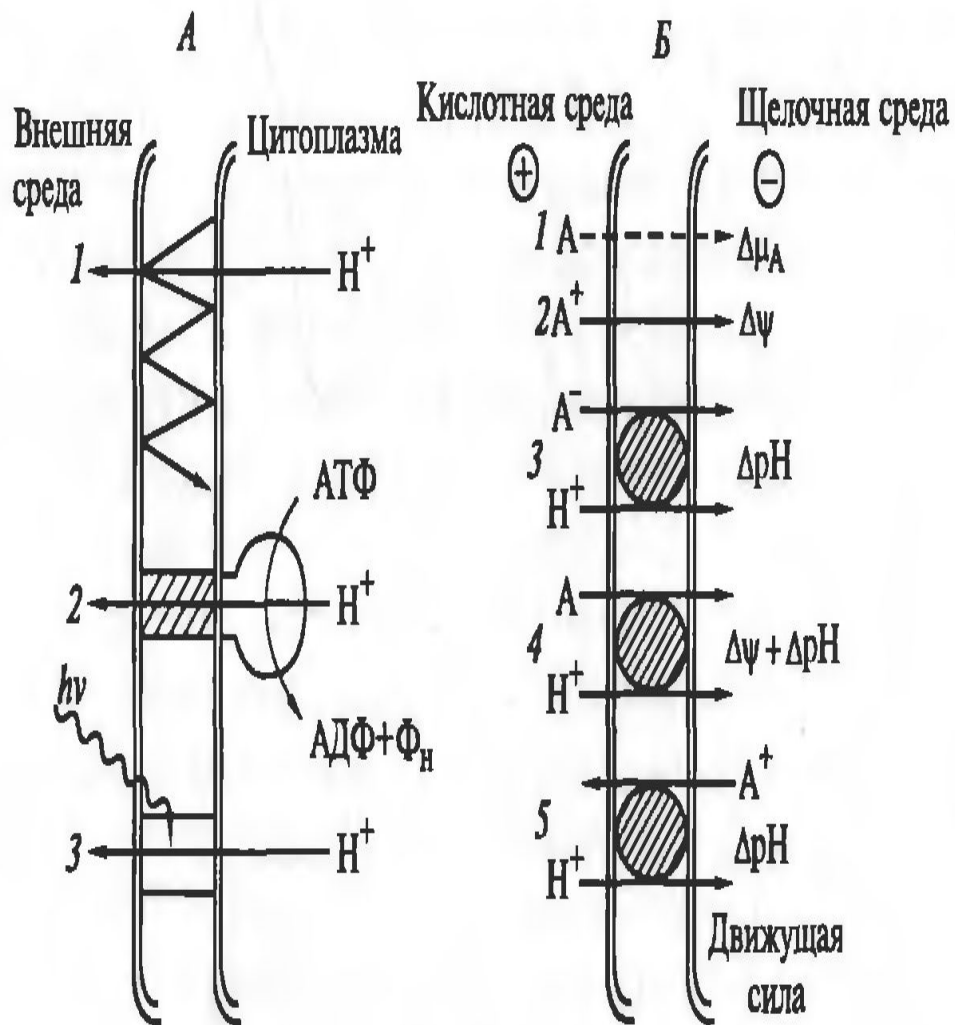
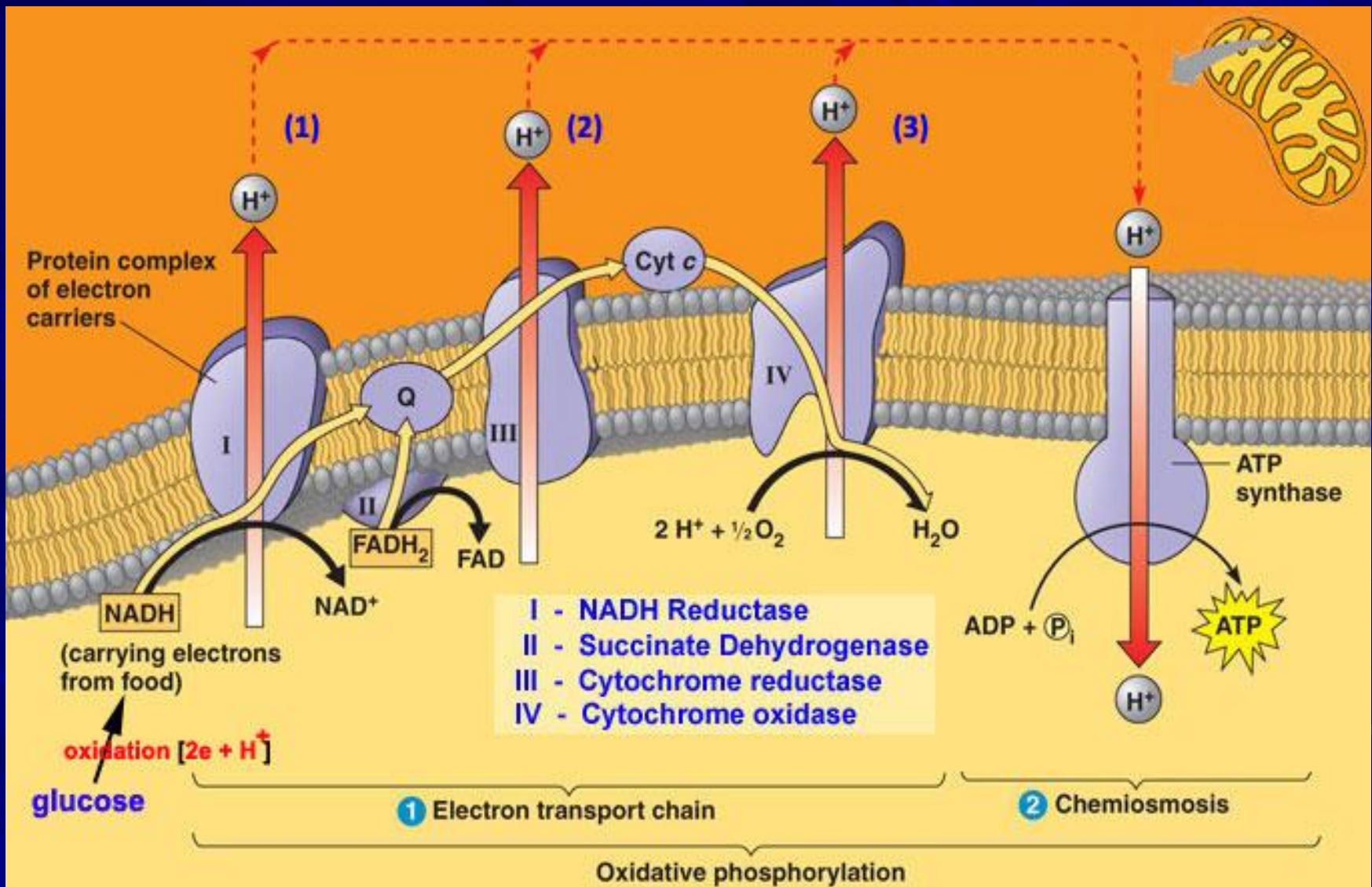


Рис. 26. Транспортные системы в клетках прокариот:

Организация дыхательной цепи



У микроорганизмов существует несколько типов богатых энергией соединений.

Самые многочисленные:

- ацилфосфаты,
- нуклеотидди- и трифосфаты,
- аденозинфосфосульфат
- ацилтиоэфиры

При анаэробном дыхании

происходит перенос высокоэнергетической фосфатной группы от молекулы-донора на АДФ с образованием АТФ.

Субстратное фосфорилирование



Энергетический процесс	Конечный акцептор электронов	Продукты восстановления
Нитратное дыхание и денитрификация	NO_3^- , NO_2^-	NO_2^- , NO , N_2O , N_2
Сульфатное и серное дыхание	SO_4^{2-} , S^0	H_2S
Карбонатное дыхание	CO_2	ацетат
Фумаратное дыхание	фумарат	сукцинат

Ферментативный (бродильный) метаболизм

Процесс получения энергии при котором отщепленный от субстрата водород переносится на органические соединения.

Брожение разновидность анаэробного дыхания.



В зависимости от типа конечных продуктов различают:

- Спиртовое брожение
- Маслянокислое
- Молочнокислое
- Муравьинокислое
- Уксуснокислое
- Пропионовокислое и др.

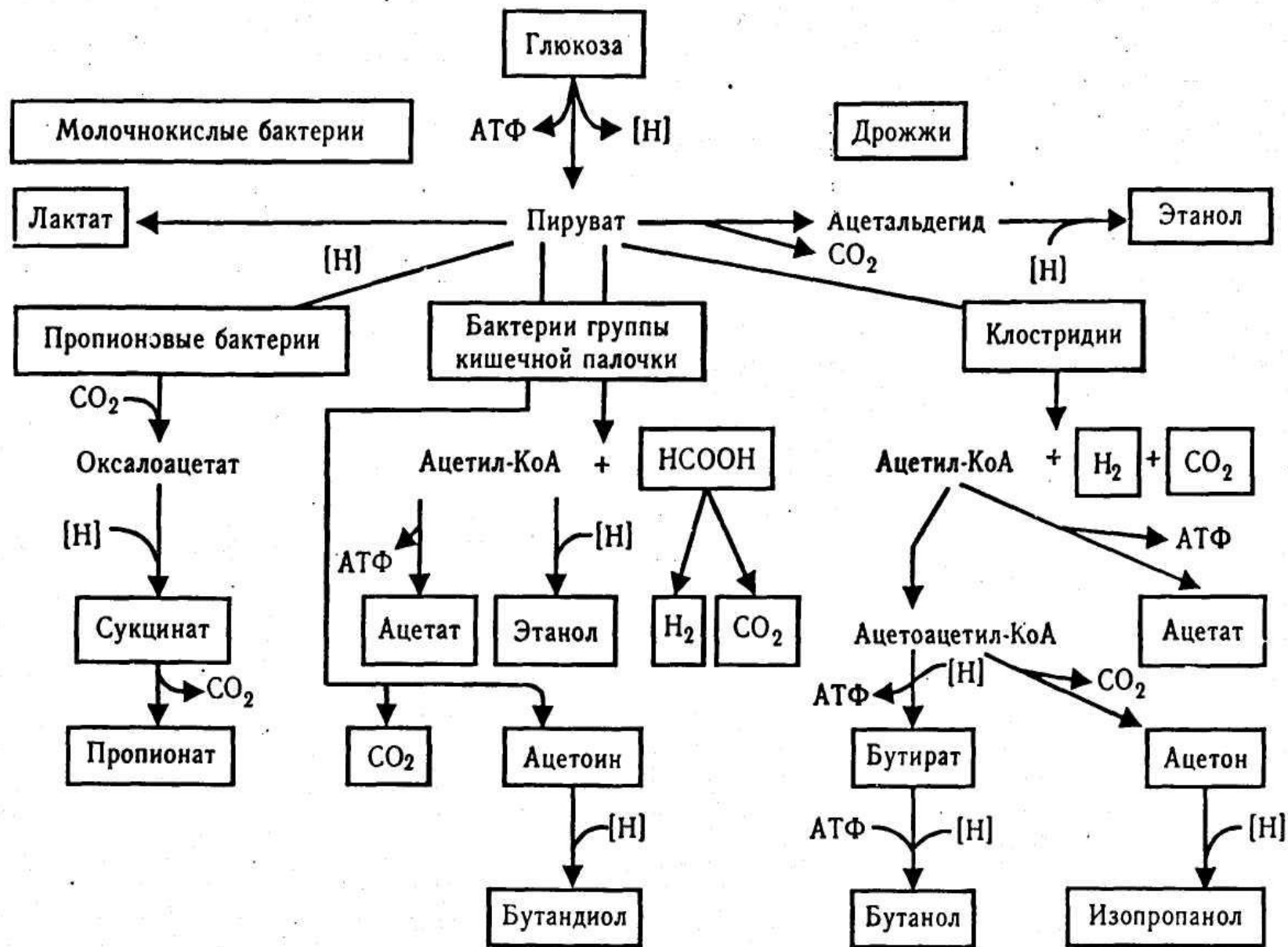


Рис. 53. Суммарная схема важнейших типов брожения (по Г. Шлегелю).

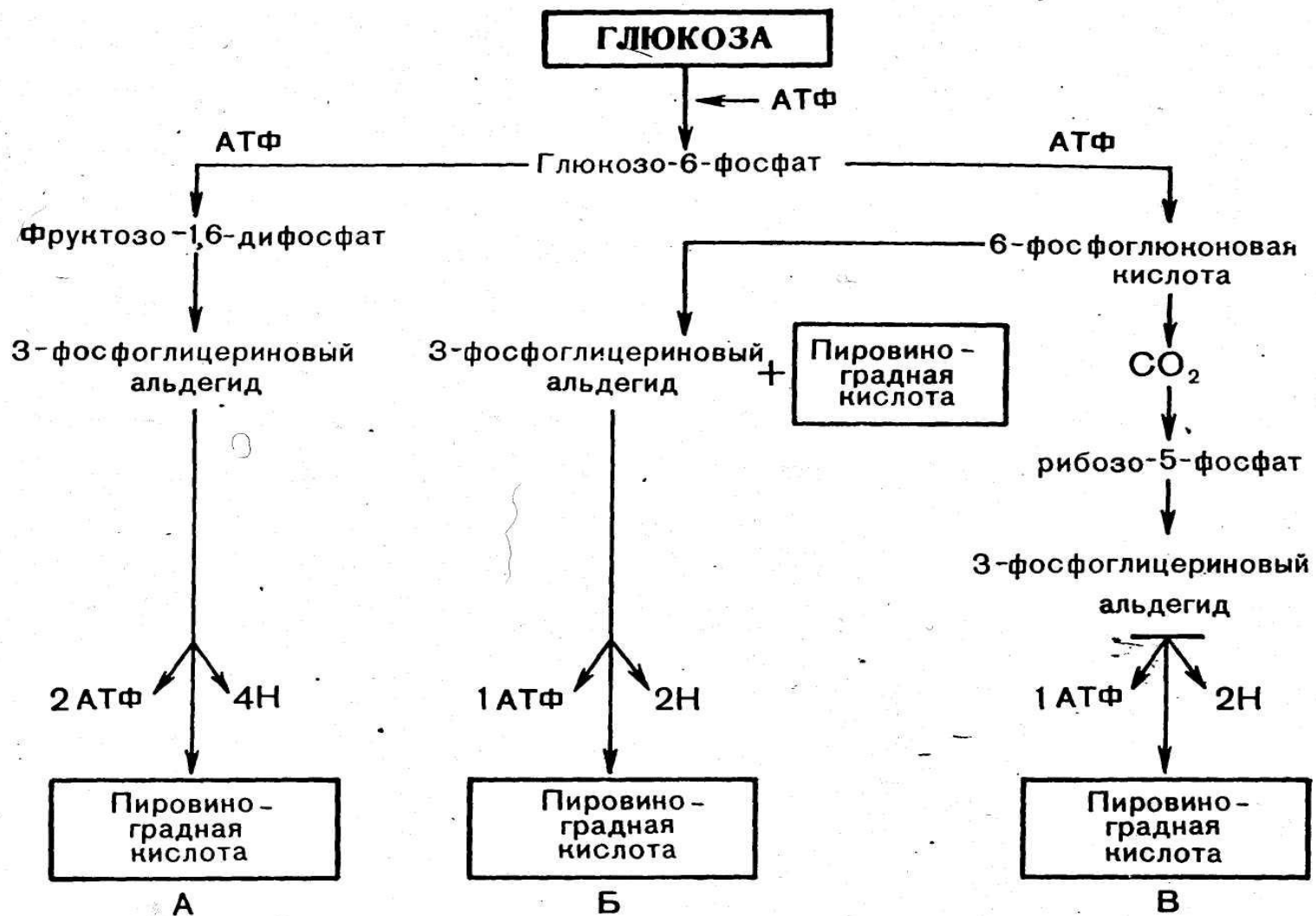


Схема путей превращения глюкозы в пировиноградную кислоту в клетках прокариот:
 А — схема Эмбдена — Мейергофа — Парнаса; Б — схема Энтнера — Дудорова;
 В — пентозофосфатный путь.

По способу дыхания

- Анаэробы (облигатные – для них кислород токсичен; факультативные - растут и размножаются как при присутствии O_2 , так и без него);
- Аэробы (облигатные)-содержание кислорода не ниже парциального давления воздуха до 40%
- Микроаэрофилы- при пониженной концентрации O_2 (ниже 2%).
- Капнофилы- пониженное содержание O_2 и повышенное CO_2 .



Ферменты бактерий

Все метаболические процессы протекающие в микроорганизмах являются ферментозависимыми.

Набор ферментов конкретных микроорганизмов определяется их генетической информацией.

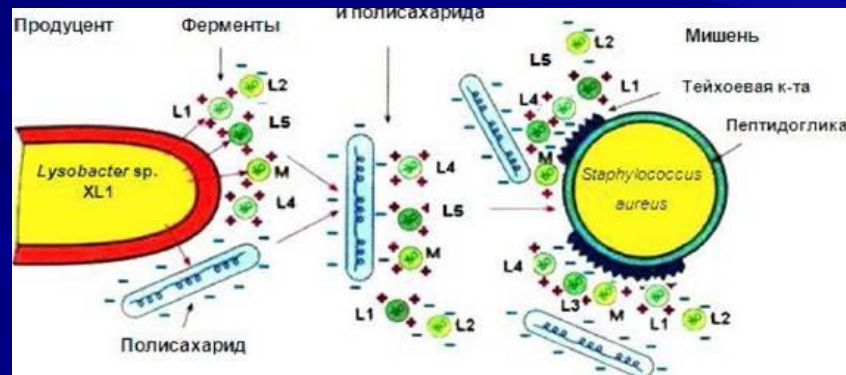


По своей природе

ферменты-белки.

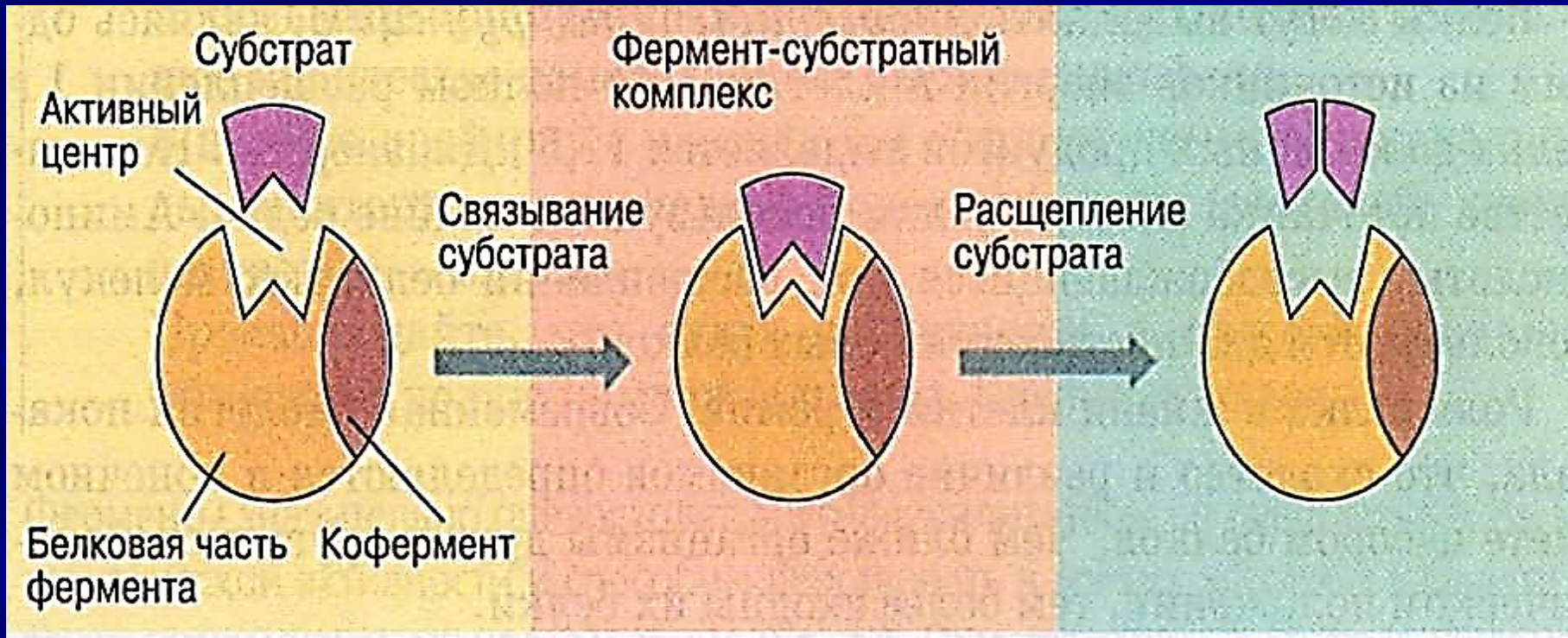
- Ферменты распознают соответствующие субстраты,
- вступают с ними во взаимодействие,
- ускоряют протекание химических реакций.
- Могут быть связаны с конкретными структурами микробной клетки.

Ферменты могут функционировать самостоятельно, или образовывать взаимосвязанные комплексы.



Классификация ферментов

(International Union of Biochemistry)
класс – подкласс– субподкласс.

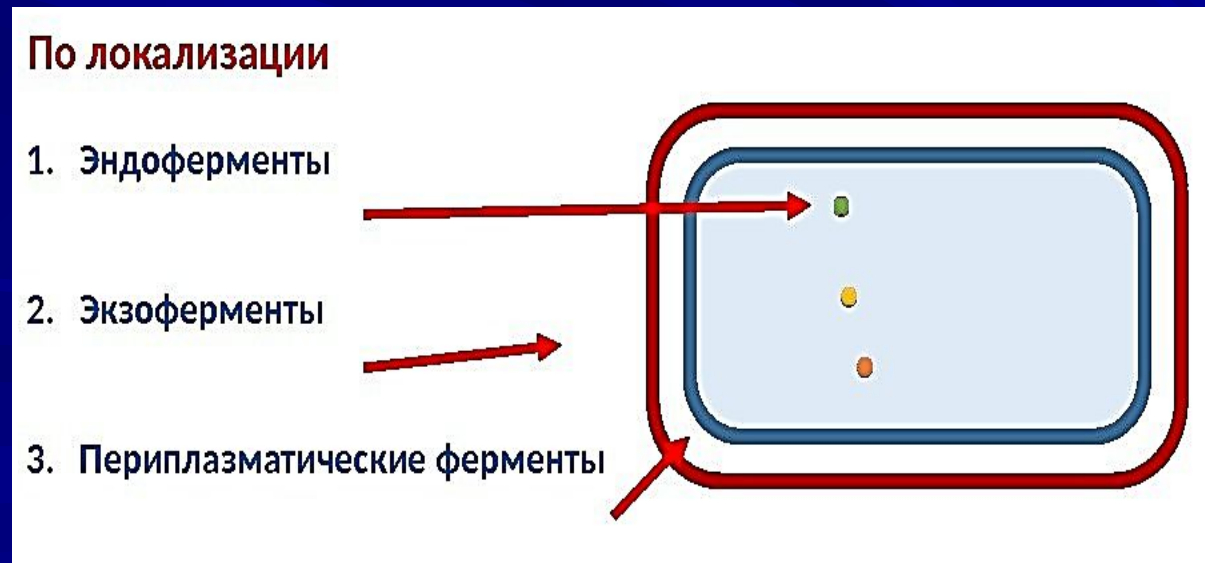


Оксидо-редуктазы	окислительно-восстановительные ферменты: дегидрогеназы, оксидазы.
лиазы	отщепляют от субстратов группы негидролитическим путем (карбоксилазы)
гидролазы	расщепляют вещества на более простые с присоединением воды (эстеразы, фосфатазы, глюкозидазы и др.)
изомеразы	превращают органические соединения в их изомеры (фосфо-гексоизомераза)
Лигаза - синтетазы	ускоряют синтез сложных соединений из более простых (аспарагинсинтетаза, глутаминсинтетаза)
Транс-феразы	переносят отдельные радикалы и атомы от одних соединений к другим.

По месту действия

различают:

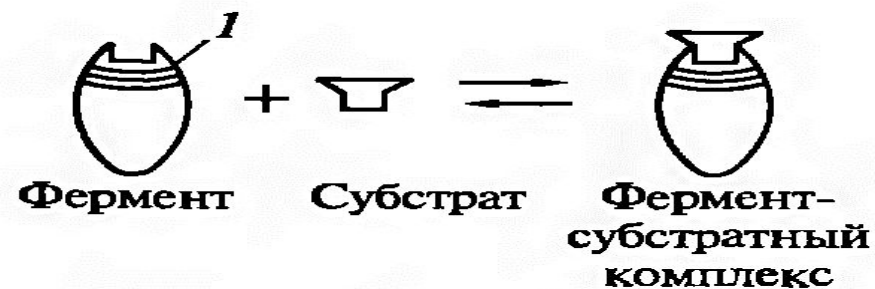
- Эндоферменты, катализируют метаболизм, проходящий внутри клетки;
- Экзоферменты- выделяются клеткой в окружающую среду, расщепляя макромолекулы питательных субстратов до простых соединений, усваиваемых клеткой.



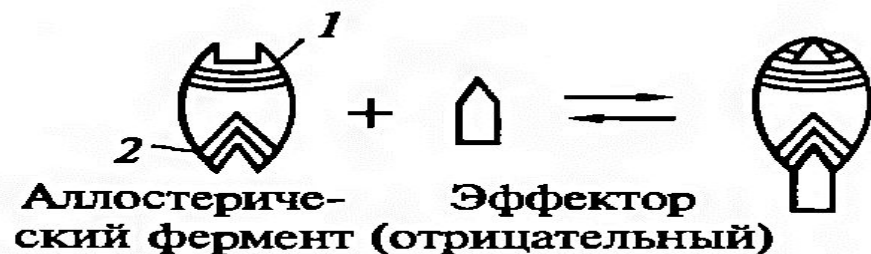
- Конститутивные ферменты- постоянно синтезируются в микробных клетках в определенных концентрациях (ферменты гликолиза).
- Индуцибельные (адаптивные) ферменты
- их концентрация резко возрастает в зависимости от наличия соответствующего субстрата



- Алlostерические ферменты – их активность меняется в зависимости от взаимодействия с метаболитами или субстратами. Активатором выступает субстрат. Накопление конечных продуктов метаболизма приводит к их ингибированию.



A



B



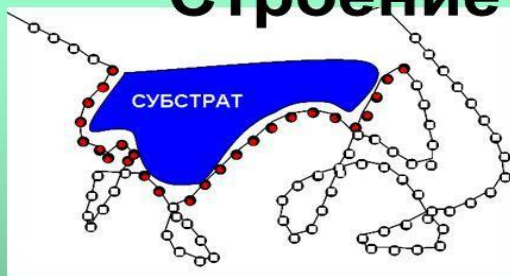
V

Рис. 29. Связывание субстрата с ферментом (*A*) и действие отрицательного (*B*) и положительного (*V*) эффектора на каталитическую активность алlostерического фермента:

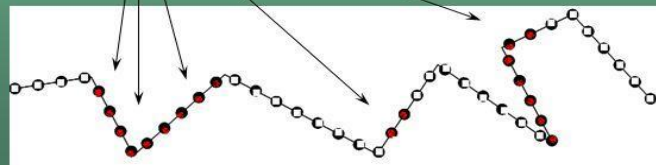
В зависимости от химической природы субстрата различают ферменты:

- сахаролитические,
- протеолитические,
- липолитические.

Строение ферментов



Аминокислоты, образующие активный центр



Строение активного центра фермента



Методы определения ферментативной активности

- Химический метод – количественное определение субстрата или продуктов с помощью химических реагентов (гликозилгидролазы – по образованию восстанавливающих сахаров).
- Спектрофотометрический метод – измерение скорости ферментативной реакции по изменению поглощения субстрата при характеристической длине волны (лиазы – по образованию двойной связи).



- Манометрический метод – определение количества газа, выделяющегося в процессе реакции (оксидазы – по поглощению O_2 , декарбоксилазы – по выделению CO_2).
- Поляриметрический метод – фиксируется изменение оптического вращения (β -фруктофуранозидаза).
- Хроматографический – количественное определение субстрата или продуктов с помощью различных видов хроматографии: бумажной (анализ сахаров), тонкослойной (гликозидов со сложными агликонами), ВЭЖХ (аминокислотный анализ и др.).

Питательные среды

Используют для выращивания микроорганизмов в искусственных условиях.

Они могут быть по консистенции: плотными, жидкими, полужидкими.

В зависимости от набора питательных веществ - простыми и сложными.



По целевому назначению питательные среды

- Универсальные (МПА, МПБ);
- Элективные (ЖСА, желчный бульон);
- Дифференциально-диагностические (Эндо, Плоскирева);
- Специальные: транспортные, обогащения, с повышенной питательной ценностью и др.



Элективныe (избирательные) питательные среды

- Обеспечивают преимущественный рост определенной группы бактерий (желточно-солевой агар, желчный бульон)



Дифференциально-диагностические среды

- Позволяют дифференцировать группы или виды бактерий по ферментативной активности
- *Среды Эндо, Левина, Плоскирева* – по способности и неспособности ферментировать лактозу
- *Среды Гисса* – используются на 3 этапе выделения чистой культуры для определения спектра сахаролитической активности.



Этапы выделения чистой культуры бактерий

1 этап:

- микроскопия мазков или нативного материала;
- посев на чашки с набором питательных сред (ЭС, ДДС, СО).

2 этап:

- Изучение морфологии клеток и их тинкториальных свойств;
- Изучение культуральных свойств изолированных колоний (Пересев на скошенный агар)

3 этап:

- Проверка однородности выделенной культуры;
- Идентификация культуры по биохимическим и антигенным свойствам,
- определение вирулентных свойств (лабораторных животных)
- определение чувствительности в антибиотикам и бактериофагам

Рост бактерий

- Координированное увеличение количества всех компонентов микробной клетки (массы клетки).



Размножение бактерий

- Увеличение количества клеток в популяции


Поперечное деление:

- Синтеза поперечной перегородки (у грам+ бактерий)
- Образования перетяжки (у грам «-» бактерий)



Эффективность размножения микроорганизмов оценивается:

- Концентрацией клеток культуры в мл.

 Временем генерации- промежутком времени за
который число клеток удваивается

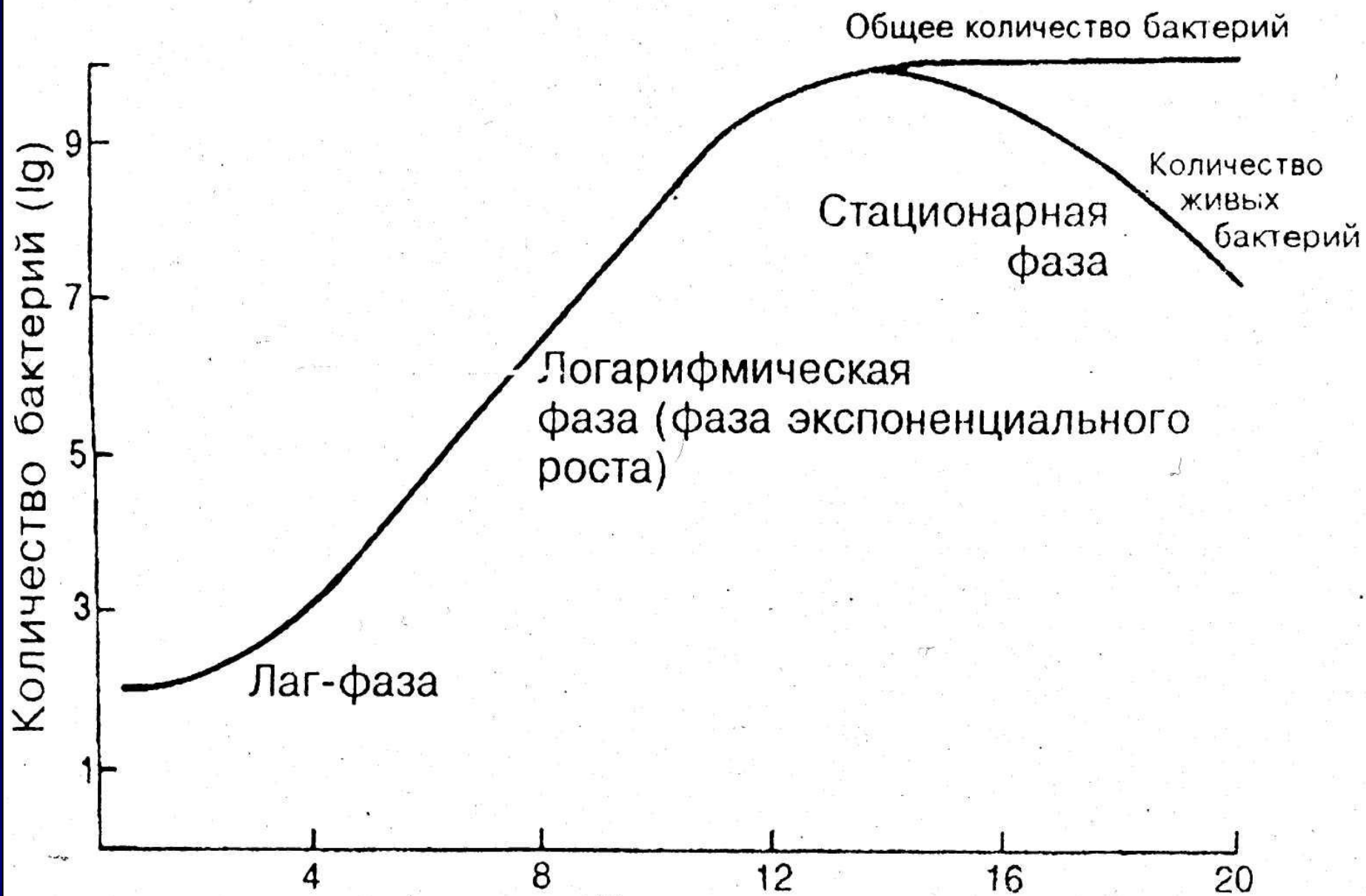
 Константой скорости деления- число удвоений в
час

- Константой скорости роста



Стадии развития микроорганизмов в жидкой питательной среде:

- Стационарная фага (отсутствия роста) длится 1 -2 часа.
- Лаг-фаза- приспособления. Размножение бактерий идет медленно в следствие адаптации к условиям среды
- Лог-фаза- экспоненциального роста. Увеличение количества бактерий в геометрической прогрессии.
- Фаза отрицательного ускорения - уменьшения скорости деления бактерий
- Стационарная фаза. Количество погибающих и образующихся клеток равно.
- Фага гибели- включает в себя гибель микроорганизмов вначале в логарифмической прогрессии, а затем скорость отмирания снижается.
- Бактерии могут сохраняться в виде покоящихся форм и спор.

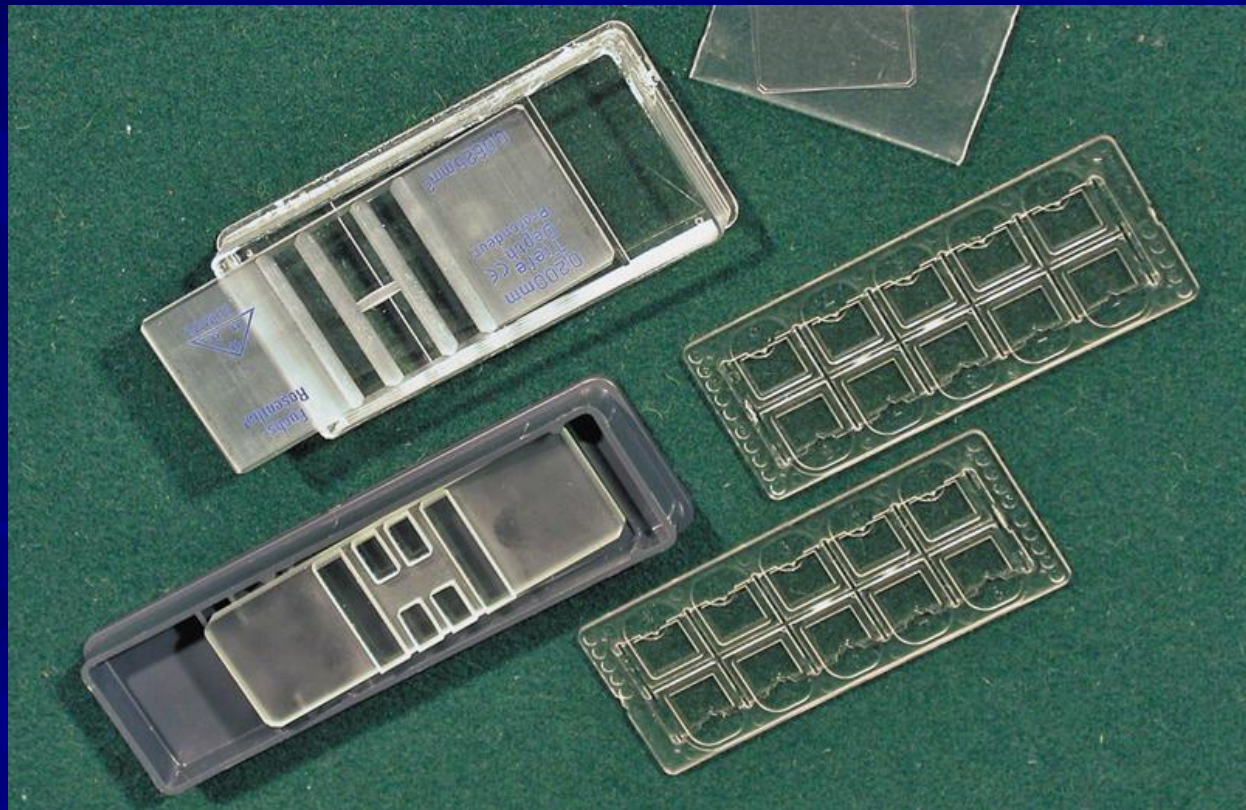


На плотной среде
бактерии образуют
колонии, которые
различаются по
своим свойствам



Методы оценки состояния микробной культуры

Прямые (непосредственный подсчет клеток под микроскопом в счетных камерах или фиксированных мазках)



- Косвенные (высев на плотные питательные среды, осаждение на мембранных фильтрах, мутность суспензии, определение биомассы, общего азота, белка и др.)



Метод проточной
цитометрии
позволил изучать
физиологическое
состояние
отдельных клеток.



- Каротиноиды- жирорастворимые пигменты красного, желтого и оранжевого цвета (микобактерии)
- Пирроловые- спирторастворимые: продиггизин (*Serratia marcescens*);
- Фенозиновые- водорастворимые пигменты синие или зеленые:
пиоцианин (синегнойная палочка)
- Меланины- нерастворимые пигменты черного и коричневого цвета (порфириомонасы)

Благодарим за внимание!