

Тема занятия: Физиология и биохимия бактерий

1. Химический состав бактериальной клетки.
2. Ферменты бактерий.
3. Питание, дыхание, рост и размножение бактерий

- Литература: Камышева К.С. Основы микробиологии и иммунологии Уч. пособие. «Феникс», 2015 с. 70-74.

- Клетка - универсальная единица живой материи. По химическому составу существенных отличий прокариотических и эукариотических клеток нет.
- Химические элементы, входящие в состав живой материи, можно разделить на три основные группы.
- 1. *Биогенные* химические элементы (С, О, N, H). На их долю приходится 95% сухого остатка, (в т. ч. 50%- С, 20%- О, 15%- N, 10%- H).
- 2. *Макроэлементы*- P, S, Cl, K, Mg, Ca, Na. На них приходится около 5 %.
- 3. *Микроэлементы*- Fe, Cu, I, Co, Mo и др. На них приходятся доли процента, однако они имеют важное значение в обменных процессах.

- Химические элементы входят в состав различных веществ - воды, белков, липидов, нейтральных жиров, углеводов, нуклеиновых кислот.
- Синтез соединений контролируется генами.
- Многие вещества бактериальная клетка может получать извне - из окружающей среды или организма хозяина.

- *Вода* составляет от 70 до 90 % биомассы. Содержание воды больше у капсульных бактерий, меньше всего - в спорах.
- *Белки* встречаются во всех структурных элементах клетки.
- Белки могут быть более простые (протеины) и сложные (протеиды), в чистом виде или в комплексе с липидами, сахарами.
- Выделяют структурные (структурообразующие) и функциональные (регуляторные) белки, к последним относятся ферменты.

- **В состав белков** входят как обычные для эукариотов аминокислоты, так и оригинальные - *диаминопимелиновая, D-аланин, D-глутанин*, входящие в состав пептидогликанов и капсул некоторых бактерий.
- Только в спорах находится *дипиколиновая кислота*, с которой связана высокая резистентность спор.
- Жгутики построены из белка *флагеллина*, обладающего сократительной способностью и выраженными антигенными свойствами. Пили (ворсинки) содержат особый белок - *пилин*.

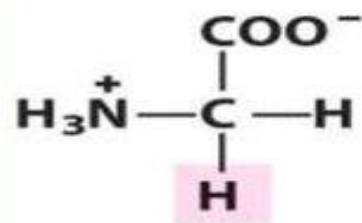
Строение аминокислот



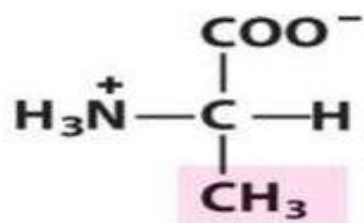
Каждая из 20 аминокислот имеет одинаковую часть (**NH₂ — CH — COOH**) и отличается от любой другой аминокислоты **R-группой**, или **радикалом**

Стандартные аминокислоты (20 а.к.)

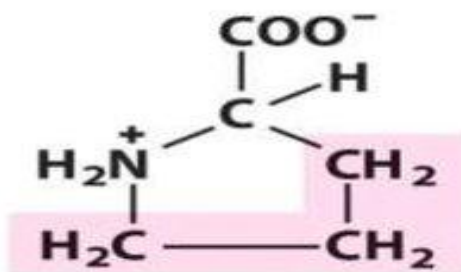
Неполярные алифатические R группы



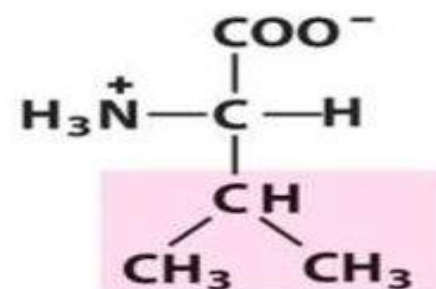
Глицин (Gly)



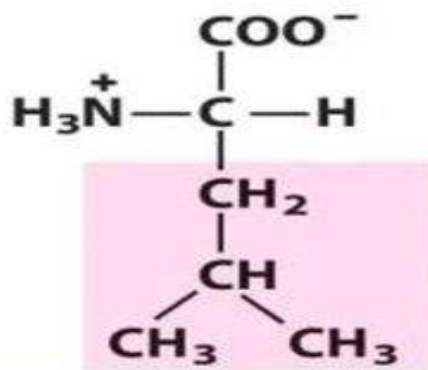
Аланин (Ala)



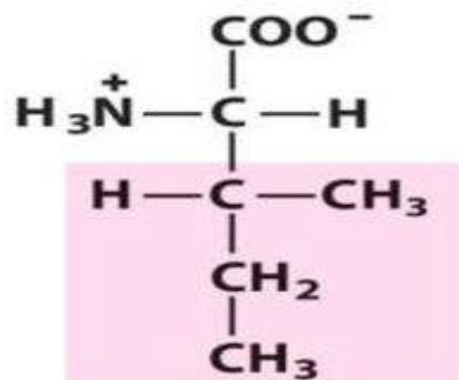
Пролин (Pro)



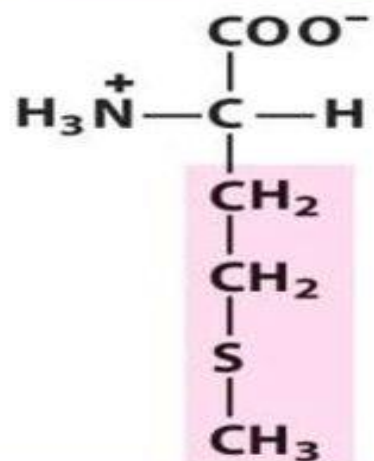
Валин (Val)



Лейцин (Leu)



Изолейцин (Ile)



Метионин (Met)

- Пептидную природу имеют капсулы представителей рода *Bacillus*, возбудителя чумы, поверхностные антигены ряда бактерий, в том числе стафилококков и стрептококков.
- *Белок А* - специфический белок *S.aureus* - фактор, обуславливающий ряд свойств этого возбудителя.
- *Белок М* - специфический белок гемолитических стрептококков серогруппы А, позволяющий дифференцировать серовары (около 100), что имеет эпидемиологическое значение.

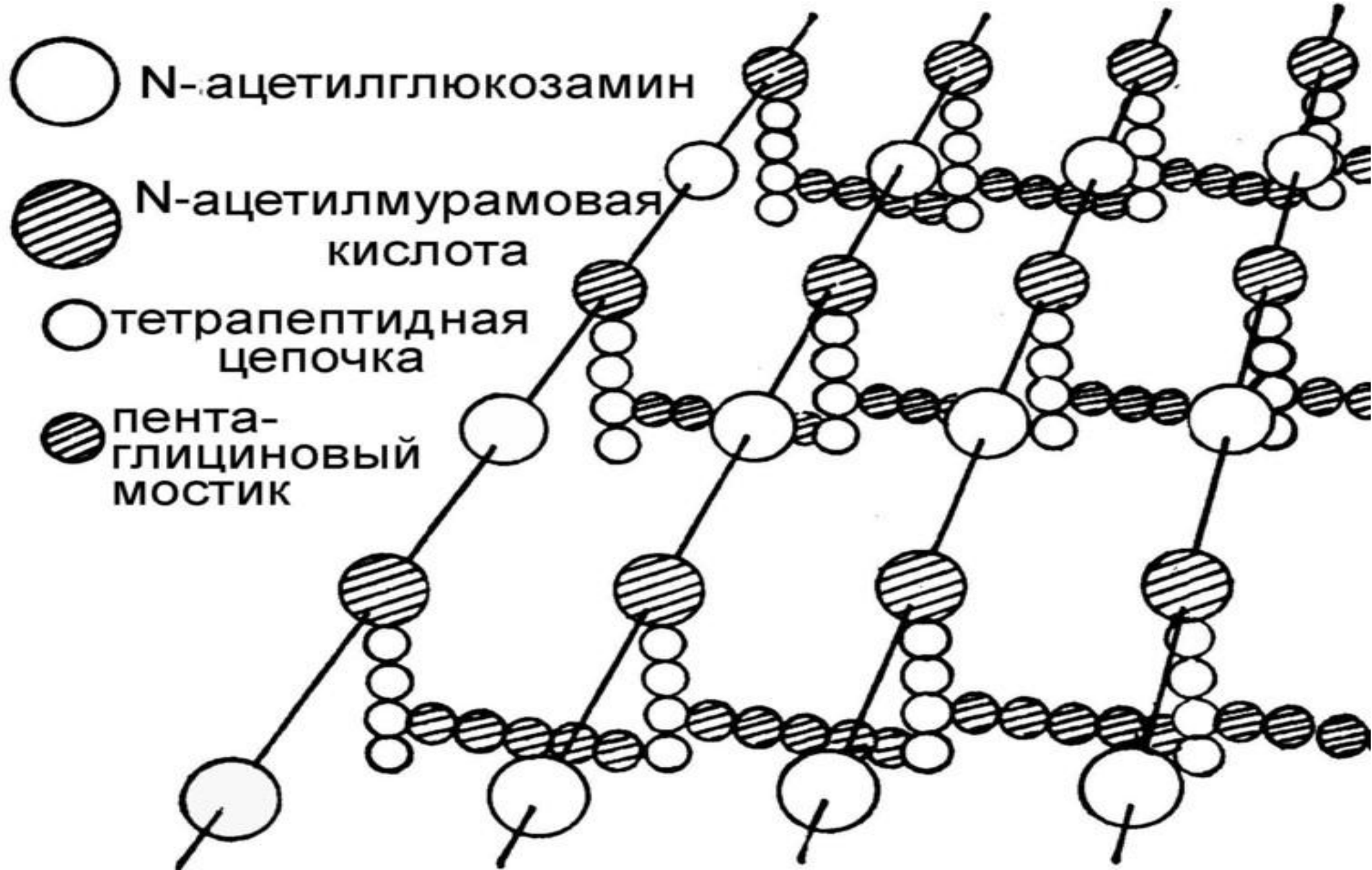
Пептиды

- Олигопептиды (до 10 аминокислотных остатков);
- Полипептиды (более 10);
- Белки – полипептиды, содержащие более 50 аминокислотных остатков.



- Ряд белков содержит наружная мембрана грамотрицательных бактерий, из которых 3 - 4 *мажорных* (основных) и более 10- второстепенных, выполняющих различные функции.
- Среди мажорных белков- *порины*, образующие диффузные поры, через которые в клетку могут проникать мелкие гидрофильные молекулы.

- Белки входят в состав **пептидогликана**- биополимера, составляющего основу бактериальной клеточной стенки.
- Он состоит из остова (чередующиеся молекулы двух аминосахаров) и двух наборов пептидных цепочек - боковых и поперечных. Наличие двух типов связей - гликозидных (между аминосахарами) и пептидных, которые соединяют субъединицы пептидогликанов, придают этому гетерополимеру структуру *молекулярной сети*.
- *Пептидогликан- наиболее устойчивое соединение, которое образует ригидную мешковидную макромолекулу, определяющую постоянную форму бактерий и ряд их свойств.*



- 1. Пептидогликан содержит родо- и видоспецифические антигенные детерминанты.
- 2. Он запускает классический и альтернативный пути активации системы комплемента.
- 3. Пептидогликан тормозит фагоцитарную активность и миграцию макрофагов.
- 4. Он способен инициировать развитие гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).

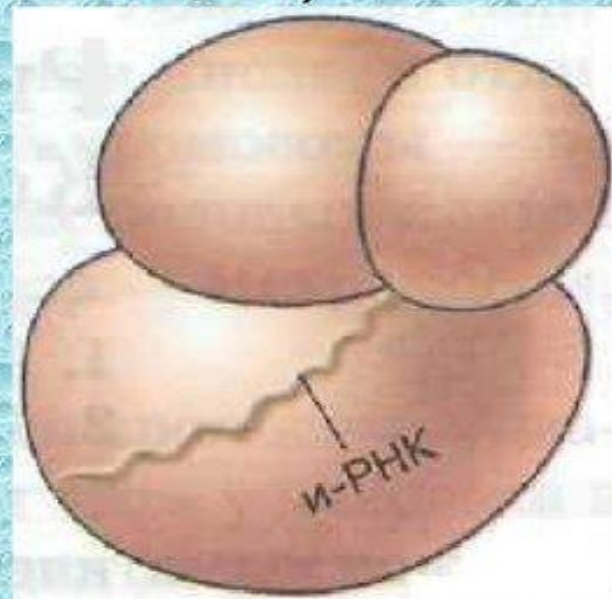
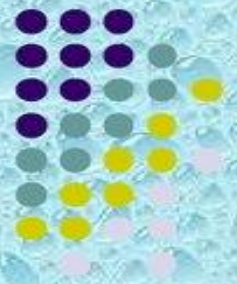
- 5. Пептидогликан обладает противоопухолевым действием.
- 6. Он оказывает пирогенное действие, т.е. вызывает лихорадку.
- Из соединений белков с небелковыми компонентами наибольшее значение имеют *липопротеиды, гликопротеиды и нуклеопротеиды.*

- Удивительное таинство жизни - синтез белка осуществляется в *рибосомах*. Существует два основных типа рибосом - 70S (S- константа седиментации, единица Сведберга) и 80S.
- Рибосомы первого типа встречаются только у прокариотов. Антибиотики не действуют на синтез белка в рибосомах типа 80S, распространенных у эукариотов.

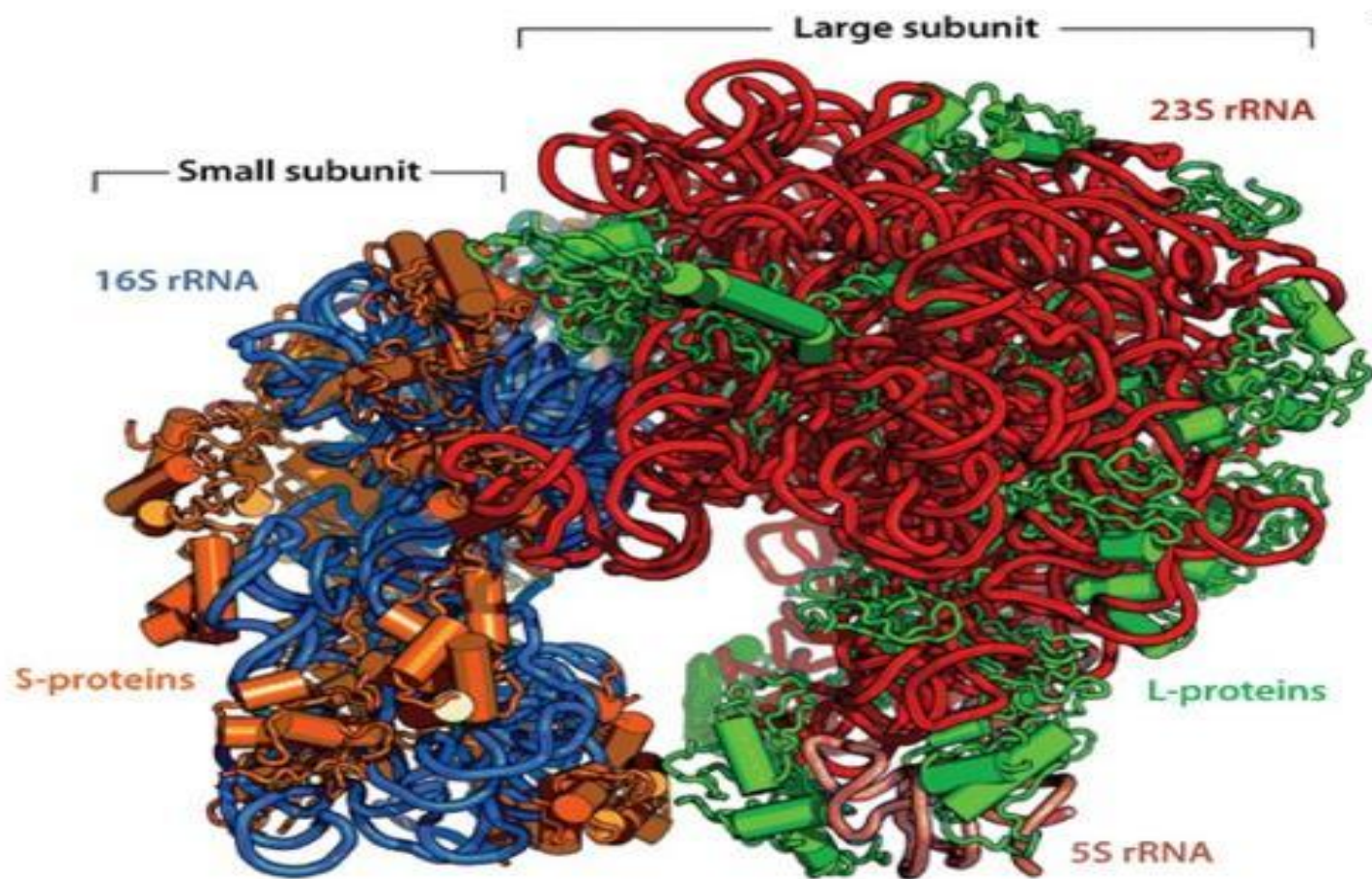
Рибосомы

Мелкие сферические тельца (15-20 нм), состоящие из двух субъединиц: **большой** и **малой**, построены из белка и рРНК. Субъединицы между собой не связаны. Рибосомы бывают двух типов **80S** (крупные) в эукариотических клетках и **70S** (мелкие) – в прокариотических клетках. Располагаются на мембранах ЭПС, на наружной ядерной мембране, в цитоплазме, в пластидах и митохондриях.

Несколько рибосом способны присоединяться к иРНК образуя **полисому**.
Функции: участие в синтезе белка (этап трансляции)



Трехмерная модель 70S-рибосомы *E. coli*, содержащей молекулы рРНК и рибосомные белки



Нобелевская премия по химии за 2009 год за трехмерную модель с высоким разрешением малой субчастицы рибосомы *E. coli*, содержащей молекулу 16S-рРНК и рибосомные белки (Венкатраман Рамакришнан, Томас Стейц и Ада Йонат).

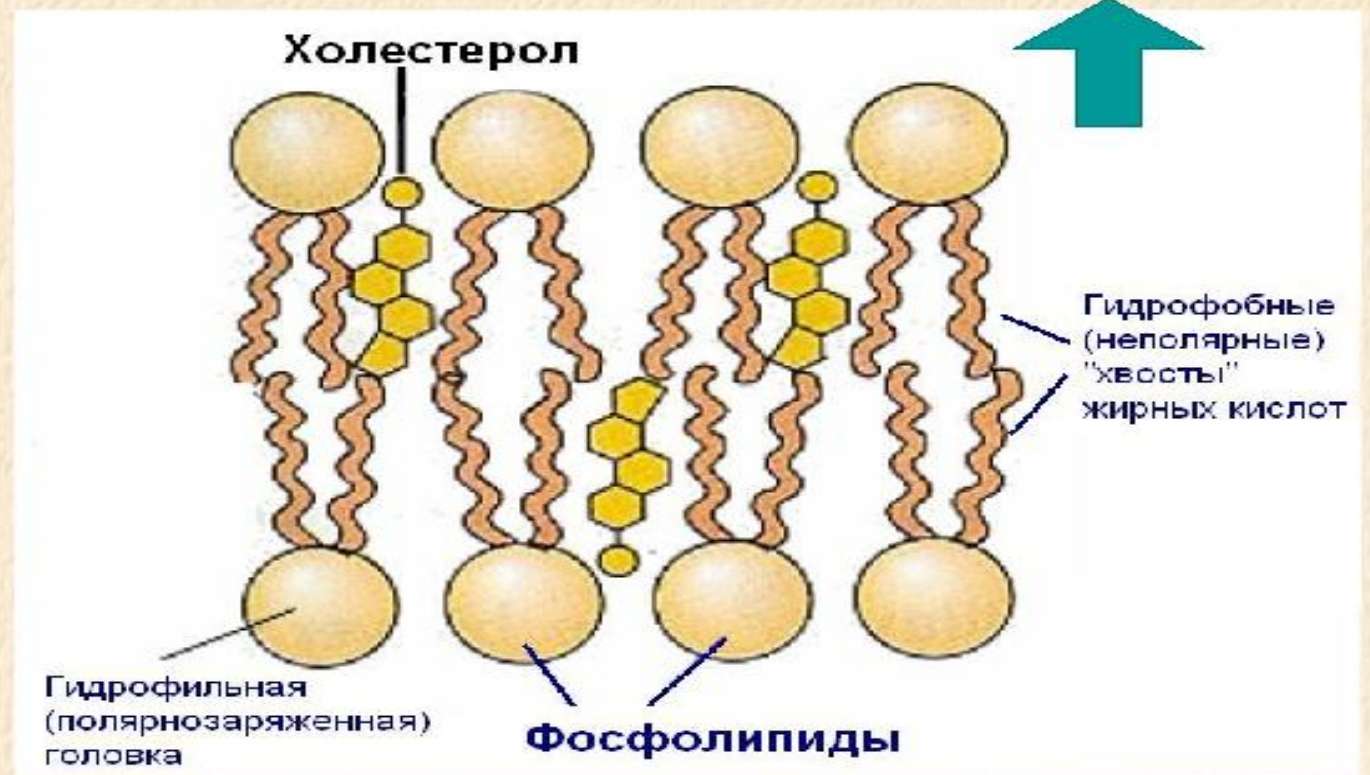
- **Липиды** (главным образом фосфолипиды) содержатся в цитоплазматической мембране (липидный бислой), в также в наружной мембране грамотрицательных бактерий.
- Есть микроорганизмы, содержащие большое количество липидов (до 40% сухого остатка)- микобактерии.
- В состав липидов входят различные *жирные кислоты*, весьма специфичные для разных групп микроорганизмов.
- Их определение имеет в ряде случаев диагностическое значение, например у анаэробов, микобактерий.

Виды липидов

ФОСФОЛИПИДЫ

Глицерин +
жирные
кислоты
+ остаток
фосфорной
кислоты

МЕМБРАНЫ КЛЕТОК



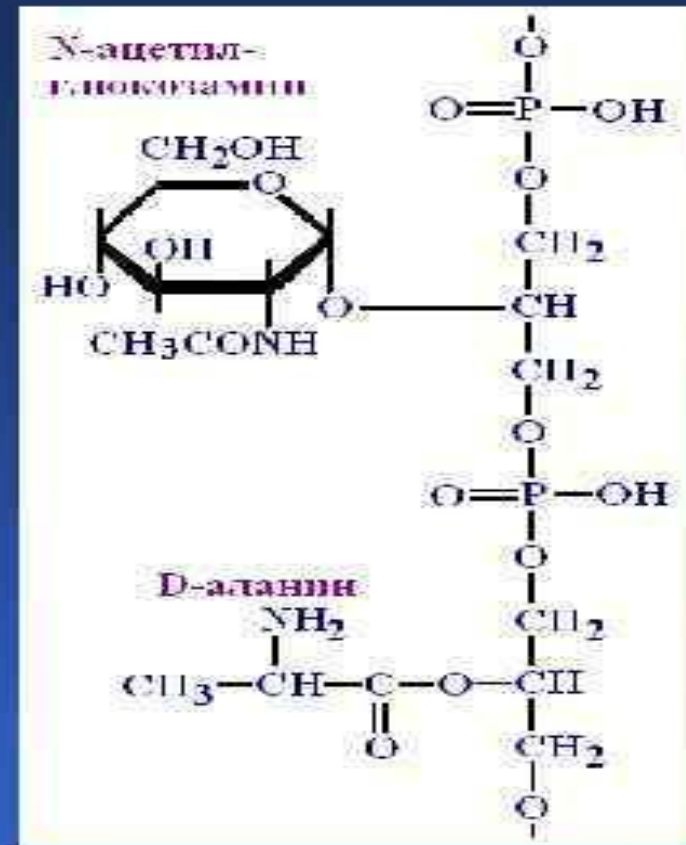
- У микобактерий туберкулеза в составе липидов имеется ряд кислотоустойчивых жирных кислот - *фтионовая, миколовая* и др. Высокое содержание липидов и их состав определяют многие свойства микобактерий туберкулеза:
 - -устойчивость к кислотам, щелочам и спиртам;
 - -трудная окрашиваемость красителями (используют специальные методы окраски, чаще - по Цилю-Нильсену);
 - -устойчивость возбудителя к солнечной радиации и дезосредствам;
 - - патогенность.

- *Тейхоевые кислоты* встречаются в клеточных стенках грамположительных бактерий. Представляют собой водорастворимые линейные полимеры, содержащие остатки глицерина или рибола, связанные фосфодиэфирными связями.
- С тейхоевыми кислотами связаны главные поверхностные антигены ряда грамположительных бактерий.

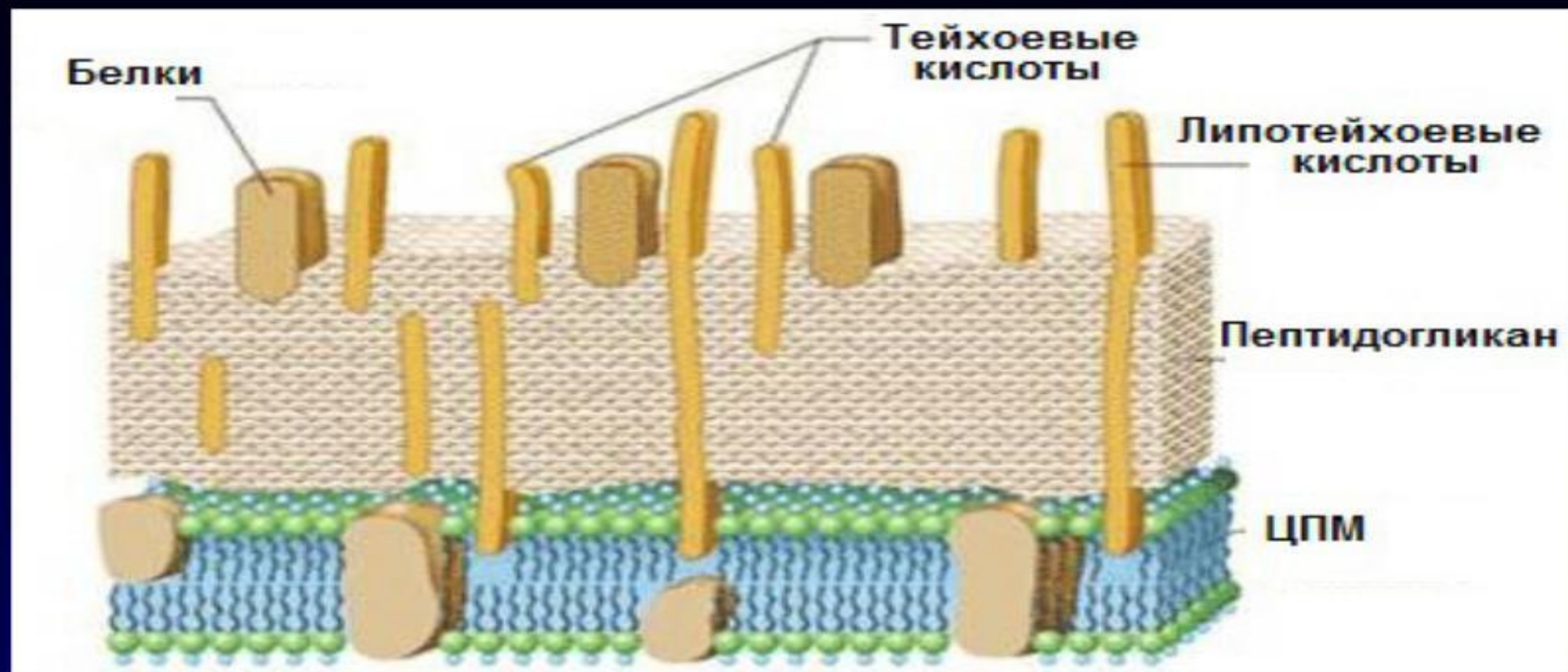
Тейхоевые кислоты — обнаружены у грамположительных бактерий.

Функции:

- являются антигенами;
- определяют поверхностный заряд клетки;
- рецепторы для фагов.



Структура глицеринтейхоевой кислоты



- **Углеводы** встречаются чаще в виде *полисахаридов*, которые могут быть экзо - и эндоклеточными.
- Среди экзоклеточных полисахаридов выделяют каркасные (входят в состав капсул) и истинно экзополисахариды (выходят во внешнюю среду).
- Среди бактериальных полисахаридов многие находят медицинское применение. *Декстраны* - полисахариды с большой молекулярной массой, по виду напоминают слизь. 6% раствор-кровезаменитель полиглюкин.
- Декстрановый гель *сефадекс* используется в колоночной хроматографии как молекулярное сито. Сефадексы, синтетические производные полисахарида декстрана, в полимерные молекулы которых введены поперечные "сшивки", образующие трёхмерную сетку с порами заданного размера (т. н. молекулярные сита).
- Эндоклеточные полисахариды - запасные питательные вещества клетки (крахмал, гликоген и др.).

- Липополисахарид (ЛПС) - один из основных компонентов клеточной стенки грамотрицательных бактерий, это соединение липида с полисахаридом. ЛПС состоит из комплекса:

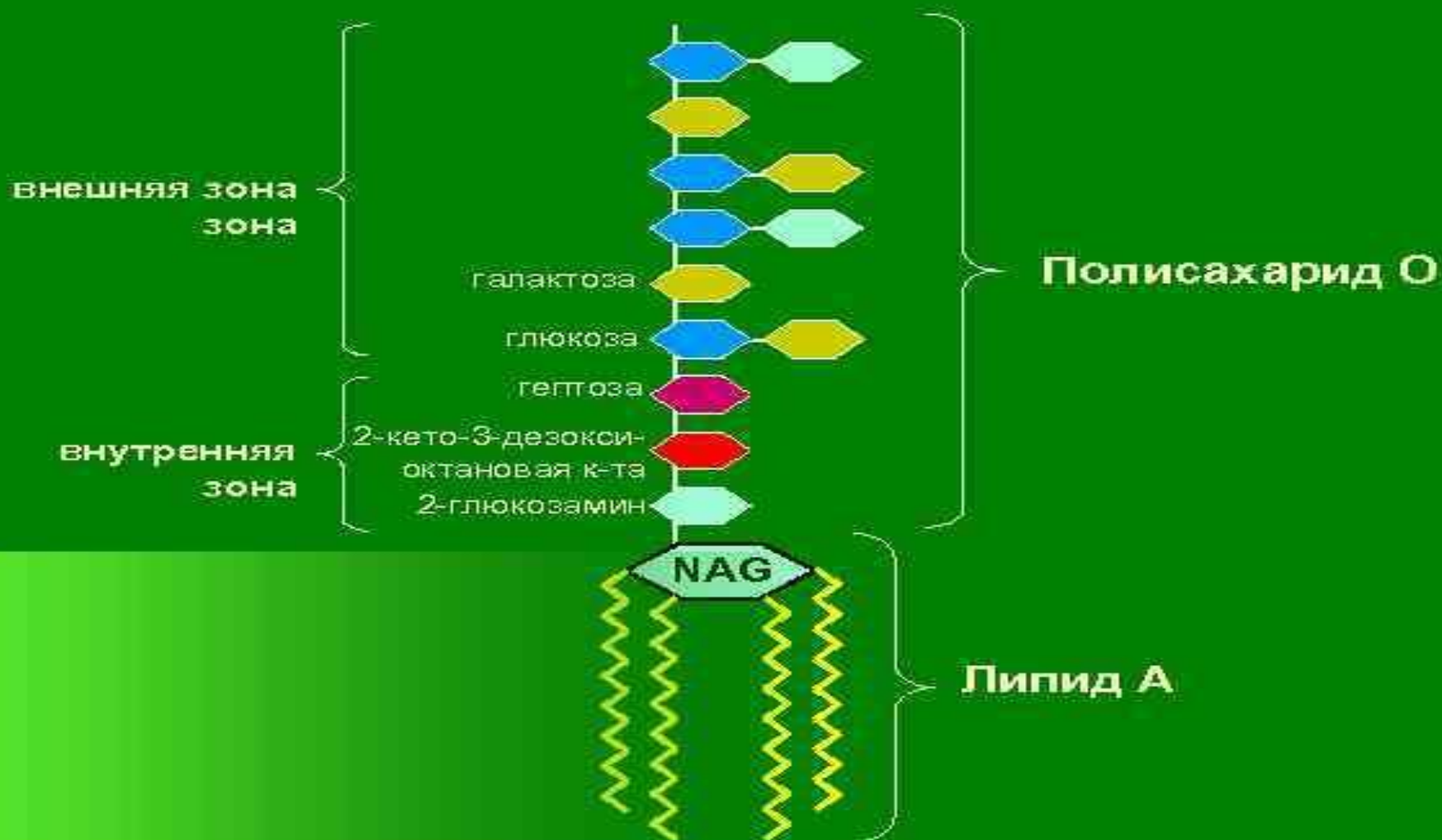
- 1. Липид А.

- 2. Одинаковое для всех грамотрицательных бактерий *полисахаридное ядро*.

- 3. Терминальная сахаридная цепочка (*О-специфическая боковая цепь*).

- Синонимы ЛПС - эндотоксин, О- антиген.

4. Липополисахарид грамотрицательных бактерий



- ЛПС выполняет две основные функции - определяет антигенную специфичность и является одним из основных факторов патогенности. Это - эндотоксин, токсические свойства которого проявляются преимущественно при разрушении бактериальных клеток.
- Его токсичность определяется липидом А.
- ЛПС запускает синтез более 20 биологически активных веществ, определяющих патогенез эндотоксикоза, обладает пирогенным

- **Нуклеиновые кислоты - ДНК и РНК.**
Рибонуклеиновые кислоты (РНК) находятся главным образом в рибосомах (р-РНК- 80- 85%), т(транспортные)- РНК- 10%, м(матричные)- РНК- 1- 2%, главным образом в одноцепочечной форме.
- ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) может находиться в ядерном аппарате (хромосомная ДНК) или в цитоплазме в специализированных образованиях - плаزمидах- плазмидная (внехромосомная) ДНК.

- Микроорганизмы отличаются по структуре нуклеиновых кислот, содержанию *азотистых оснований*.
- Генетический код состоит всего из четырех букв (оснований) - А (аденин), Т (тимин), Г (гуанин) и Ц (цитозин).
- Наиболее часто для характеристики микроорганизмов используют как таксономический признак процентное соотношение Г/Ц, которое существенно отличается у различных групп микроорганизмов.

- Микроорганизмы синтезируют различные **ферменты** - специфические белковые катализаторы. У бактерий обнаружены ферменты 6 основных классов.
- 1. Оксидоредуктазы - катализируют окислительно-восстановительные реакции.
- 2. Трансферазы - осуществляют реакции переноса групп атомов.
- 3. Гидролазы - осуществляют гидролитическое расщепление различных соединений.

- 4.Лиазы - катализируют реакции отщепления от субстрата химической группы негидролитическим путем с образованием двойной связи или присоединения химической группы к двойным связям.
- 5.Лигазы или синтетазы- обеспечивают соединение двух молекул, сопряженное с расщеплением пирофосфатной связи в молекуле АТФ или аналогичного трифосфата.
- 6.Изомеразы - определяют пространственное расположение групп элементов.

- В соответствии с механизмами генетического контроля у бактерий выделяют три группы ферментов:
 - *конститутивные*, синтез которых происходит постоянно;
 - *индуцибельные*, синтез которых индуцируется наличием субстрата;
 - *репрессибельные*, синтез которых подавляется избытком продукта реакции.

- Ферменты бактерий делят на *экзо - и эндоферменты*. Экзоферменты выделяются во внешнюю среду, осуществляют процессы расщепления высокомолекулярных органических соединений.
- Способность к образованию экзоферментов во многом определяет *инвазивность* бактерий-способность проникать через слизистые, соединительнотканые и другие тканевые барьеры.

ФЕРМЕНТЫ БАКТЕРИЙ

(по составу)

Простые

(трипсин, пепсин)

Сложные

(Цитохромоксидаза,
пероксидаза)

(по действию)

Экзоферменты

(выделяются во внешнюю
среду – факторы агрессии)

Эндоферменты

(необходимы для внутренних
процессов жизнедеятельности
клетки)



- Примеры: *гиалуронидаза* расщепляет гиалуроновую кислоту, входящую в состав межклеточного вещества, что повышает проницаемость тканей (клостридии, стрептококки, стафилококки и многие другие микроорганизмы);
- *нейраминидаза* облегчает преодоление слоя слизи, проникновение внутрь клеток и распространение в межклеточном пространстве (холерный вибрион, дифтерийная палочка, вирус гриппа и многие другие).
- К этой же группе относятся энзимы, разлагающие антибиотики.

- В бактериологии для дифференциации микроорганизмов по биохимическим свойствам основное значение часто имеют конечные продукты и результаты действия ферментов. В соответствии с этим существует микробиологическая (рабочая) классификация ферментов.
- 1. Сахаролитические.
- 2. Протеолитические.
- 3. Аутолитические.
- 4. Окислительно - восстановительные.
- 5. Ферменты патогенности (вирулентности).

- Ферментный состав клетки определяется геномом и является достаточно постоянным признаком.
- Знание биохимических свойств микроорганизмов позволяет идентифицировать их по набору ферментов.
- Основные продукты ферментирования углеводов и белков - кислота, газ, индол, сероводород, хотя реальный спектр для различных микроорганизмов намного более обширный.

- Основные ферменты вирулентности- гиалуронидаза, плазмокоагулаза, лецитиназа, нейраминидаза, ДНК-аза. Определение ферментов патогенности имеет значение при идентификации ряда микроорганизмов и выявления их роли в патологии.
- Ряд ферментов микроорганизмов широко используется в медицине и биологии для получения различных веществ (аутолитические, протеолитические), в генной инженерии (рестриктазы, лигазы).

Цефалоспорины проявляют бактерицидное действие.

Механизм действия:

- повреждение клеточной мембраны бактерий
- высвобождение аутолитических ферментов, что приводит к их гибели.

- Метаболизм микроорганизмов.
- Для роста и размножения микроорганизмы нуждаются в веществах, используемых для построения структурных компонентов клетки и получения энергии.
- **Метаболизм** (т.е. обмен веществ и энергии) имеет две составляющих- **анаболизм** и **катаболизм**.
- Анаболизм- синтез компонентов клетки (*конструктивный обмен*).
- Катаболизм- энергетический обмен, связан с окислительно- восстановительными реакциями, расщеплением глюкозы и других органических соединений, синтезом АТФ.

- Питательные вещества могут поступать в клетку в растворимом виде (это характерно для прокариот) - *осмотрофы*,
- или в виде отдельных частиц - *фаготрофы*.

- Основным регулятором поступления веществ в бактериальную клетку является цитоплазматическая мембрана.
- Существует четыре основных механизма поступления веществ: - *пассивная диффузия*- по градиенту концентрации, энергонезатратная, не имеющая субстратной специфичности;

- *облегченная диффузия* - по градиенту концентрации, субстратспецифичная, энергонезатратная, осуществляется при участии специализированных белков *пермеаз*;
- *активный транспорт* - против градиента концентрации, субстратспецифичен (специальные связывающие белки в комплексе с пермеазами), энергозатратный (за счет АТФ), вещества поступают в клетку в химически неизмененном виде;

- *транслокация (перенос групп)*- против градиента концентрации, с помощью фосфотрансферной системы, энергозатратна, вещества (преимущественно сахара) поступают в клетку в фосфорилированном виде.
- *Основные химические элементы - органогены*, необходимые для синтеза органических соединений- углерод, азот, водород, кислород.



Механизм переноса питательных веществ в клетку бактерий

1. Наиболее простой способ — **пассивная диффузия**
2. **облегченная диффузия**, которая происходит при большей концентрации вещества вне клетки, чем внутри.
3. **активной перенос**. Этот процесс наблюдается при низких концентрациях субстрата в окружающей среде
4. **транслокация радикалов** — активный перенос химически измененных молекул

- В зависимости от источника потребляемого *углерода* микробы подразделяют на *аутотрофы* (используют CO₂) и *гетеротрофы* (используют готовые органические соединения).
- В зависимости от *источника энергии* микроорганизмы делят на *фототрофы* (энергию получают за счет фотосинтеза - например, цианобактерии) и
- *хемотрофы* (энергия добывается за счет химических, окислительно-восстановительных реакций).

- Если при этом донорами электронов являются неорганические соединения, то это *литотрофы*, если органические - *органотрофы*.
- Если бактериальная клетка в состоянии синтезировать все необходимые для жизнедеятельности вещества, то это *прототрофы*.
- Если бактерии нуждаются в дополнительных веществах (факторах роста), то это *ауксотрофы*.
- Основными факторами роста для труднокультивируемых бактерий являются пуриновые и пиримидиновые основания, витамины, некоторые (обычно незаменимые) аминокислоты, кровяные факторы (гемин) и др.

• Дыхание микроорганизмов.

- Путем дыхания микроорганизмы добывают энергию.
- Дыхание- биологический процесс переноса электронов через дыхательную цепь от доноров к акцепторам с образованием АТФ.
- В зависимости от того, что является конечным акцептором электронов, выделяют *аэробное и анаэробное дыхание.*

- При аэробном дыхании конечным акцептором электронов является молекулярный кислород (O_2),
- при анаэробном - связанный кислород ($-NO_3$, $=SO_4$, $=SO_3$).

- **По типу дыхания** выделяют четыре группы микроорганизмов.
- **1. *Облигатные* (строгие) аэробы.** Им необходим молекулярный (атмосферный) кислород для дыхания.
- **2. *Микроаэрофилы*** нуждаются в уменьшенной концентрации (низком парциальном давлении) свободного кислорода. Для создания этих условий в газовую смесь для культивирования обычно добавляют CO_2 , например до 10-процентной концентрации.

- *3. Факультативные анаэробы* могут потреблять глюкозу и размножаться в аэробных и анаэробных условиях.
- Среди них имеются микроорганизмы, толерантные к относительно высоким (близких к атмосферным) концентрациям молекулярного кислорода - т.е. аэротолерантные, а также микроорганизмы которые способны в определенных условиях переключаться с анаэробного на аэробное дыхание.

- *4. Строгие анаэробы* размножаются только в анаэробных условиях т.е. при очень низких концентрациях молекулярного кислорода, который в больших концентрациях для них губителен. Биохимически анаэробное дыхание протекает по типу бродильных процессов, молекулярный кислород при этом не используется.
- Аэробное дыхание энергетически более эффективно (синтезируется большее количество АТФ).

ТИПЫ ДЫХАНИЯ БАКТЕРИЙ

Тип дыхания	Условия аэрации	Примеры	Культиви- рование
Аэробы	Свободный доступ кислорода	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Термостат
Факультативные аэробы	Свободный доступ кислорода	Большинство патогенных бактерий	Термостат
Микро-аэрофилы Капнофилы	Пониженное содержание O_2 Повышенное содержание CO_2	<i>Brucella abortus</i> <i>Helicobacter pylori</i>	Анаэро- стат, спец. обо- рудование, среда Китт- Тароцци
Облигатные анаэробы	Отсутствие доступа кислорода	<i>Clostridium tetani</i>	

- В процессе аэробного дыхания образуются токсические продукты окисления (H_2O_2 - перекись водорода, $\cdot\text{O}_2$ - свободные кислородные радикалы), от которых защищают специфические ферменты, прежде всего каталаза, пероксидаза, *пероксиддисмутаза*.
- У анаэробов эти ферменты отсутствуют, также как и *система регуляции окислительно-восстановительного потенциала ($r\text{H}_2$)*.

• Основные методы создания анаэробных условий для культивирования микроорганизмов.

- 1. Физический - откачивание воздуха, введение специальной газовой безкислородной смеси (чаще- N_2 - 85%, CO_2 - 10%, H_2 - 5%).
- 2. Химический - применяют химические поглотители кислорода.
- 3. Биологический - совместное культивирование строгих аэробов и анаэробов (аэробы поглощают кислород и создают условия для размножения анаэробов).
- 4. Смешанный - используют несколько разных подходов.

- Необходимо отметить, что создание оптимальных условий для строгих анаэробов - очень сложная задача.
- Очень непросто обеспечить постоянное поддержание бескислородных условий культивирования, необходимы специальные среды без содержания растворенного кислорода, поддержание необходимого окислительно-восстановительного потенциала питательных сред, взятие и доставка, посев материала в анаэробных условиях.

- Существует ряд приемов, обеспечивающих более подходящие условия для анаэробов-предварительное кипячение питательных сред, посев в глубокий столбик агара, заливка сред вазелиновым маслом для сокращения доступа кислорода, использование герметически закрывающихся флаконов и пробирок, шприцев и лабораторной посуды с инертным газом, использование плотно закрывающихся эксикаторов с горящей свечой.
- Используются специальные приборы для создания анаэробных условий - анаэроостаты.

- Однако в настоящее время наиболее простым и эффективным оборудованием для создания анаэробных и микроаэрофильных условий является система “Газпак” со специальными газорегенерирующими пакетами, действующими по принципу вытеснения атмосферного воздуха газовыми смесями в герметически закрытых емкостях.

• Основные принципы культивирования микроорганизмов на питательных средах.

- 1. Использование всех необходимых для соответствующих микробов питательных компонентов.
- 2. Оптимальные температура, рН, rH_2 , концентрация ионов, степень насыщения кислородом, газовый состав и давление.
- Микроорганизмы культивируют на питательных средах при оптимальной температуре в термостатах, обеспечивающих условия инкубации.

- По температурному оптимуму роста выделяют три основные группы микроорганизмов.
- 1. Психрофилы- растут при температурах ниже +20 градусов Цельсия.
- 2. Мезофилы- растут в диапазоне температур от 20 до 45 градусов (часто оптимум- при 37 градусах С).
- 3. Термофилы- растут при температурах выше плюс 45 градусов.

- Рост и размножение микроорганизмов.
- Бактериальные клетки размножаются в результате деления. Основные стадии размножения микробов в жидкой среде в стационарных условиях:
 - - лаг - фаза (начальная стадия адаптации с медленным темпом прироста биомассы бактерий);

- экспоненциальная (геометрического роста) фаза с резким ростом численности популяции микроорганизмов (2 в степени n);
- стационарная фаза (фаза равновесия размножения и гибели микробных клеток);
- стадия гибели - уменьшение численности популяции в связи с уменьшением и отсутствием условий для размножения микроорганизмов (дефицит питательных веществ, изменение рН, rH_2 , концентрации ионов и других условий культивирования).

- Данная динамика характерна для *периодических культур* с постепенным истощением запаса питательных веществ и накоплением метаболитов.
- Если в питательной среде создают условия для поддержания микробной популяции в экспоненциальной фазе - это *хемотратные (непрерывные) культуры*.

- Характер роста бактерий на плотных и жидких питательных средах: сплошной рост, образование колоний, осадок, пленка, помутнение.
- Чистая культура - популяция одного вида микроорганизмов.
- Основные принципы получения чистых культур: механическое разобщение, рассеивание, серийные разведения, использование селективных сред, особых условий культивирования (с учетом устойчивости некоторых микробов к определенным температурам, кислотам, щелочам, парциальному давлению кислорода, pH и мн. др.).