

**Физиология и биохимия бактерий.
Дыхание и размножение микробов.
Питание. Питательные среды и их
классификация.**

План

1. Химический состав бактериальной клетки: вода, белки, жиры, углеводы и минералы.
2. Питание.
 - Типы питания
 - Механизмы обмена веществ
 - Ферменты
 - Механизмы питания
3. Дыхание: аэробы и анаэробы; редокс-потенциал.
4. Рост и размножение:
 - Репликация ДНК
 - Размножение на средах
 - Классификация сред

Цель – показать взаимодействие процессов питания, дыхания, роста, развития, размножения бактерий и их особенности

Химический состав бактериальной клетки

Для отправления жизненно важных процессов бактериальная клетка (БК) должна поддерживать постоянство своего химического состава, который мало чем отличается от химического состава эукариотической клетки

ВОДА (составляет главную массу тела БК).

Вегетативная клетка – 70-98%

Спора – 40%

Часть воды, находящаяся в *свободном состоянии*, является универсальным раствором и растворителем. Большая часть воды находится *в связанном состоянии*. Количество воды подвержено большим колебаниям. При лишении воды большинство бактерий сохраняют жизнеспособность, но перестают размножаться.

Лиофильная сушка.

Биохимик **А.М.Кузин** «Вода является тем фоном, на котором разворачиваются все химические процессы клетки – средой, в которой и в самой теснейшей участии которой осуществляются превращения веществ»

Химический состав бактериальной клетки

Белки (около 2000) = **40-80%** (сухой массы)

- **Протеины** – простые белки
- **Протеиды** – сложные белки (нуклеопротеиды, липопротеиды, гликопротеиды).
- Большая часть белков – **ферменты**

Углеводы = **30-50%** (сухой массы) – *полисахариды и углеводы, связанные с белками и липидами*

Липиды = **1,7 – 40%** (сухой массы) (*фосфолипиды, жирные кислоты и глицериды*).

- Основная масса в ЦПМ
- Связаны с другими веществами БК (белки, углеводы)
- Основная функция – защитная (микобактерии – кислотоустойчивые бактерии), липиды обеспечивают устойчивость к кислотам, щелочам, спиртам и т.д.

Химический состав бактериальной клетки

Минеральные вещества:

- **Фосфор** – 50 % (золы)
- **Калий** – 25% (золы)
- **Микроэлементы** – **железо** (*входит в состав окислительно-восстановительных ферментов - цитохромоксидаза, каталаза, пероксидаза и т.д.*)
- **NaCl** – *поддерживает изотоничность*
- **ДНК и РНК** = **10-30%** (сухой массы)

Питание бактерий

В теле БК, имеющей сложный химический состав непрерывно совершаются процессы обмена веществ: катаболизма (диссимиляции) и анаболизма (ассимиляции). Питание заключается в синтезе органических веществ для строительства клеточных органелл из **УГЛЕРОДА, АЗОТА, КИСЛОРОДА и ВОДОРОДА**

1. Обеспечивает поступление в клетку питательных веществ;
2. Обеспечивает клетку энергией

Бактерии потребляют – O, H, C и N.

По потреблению **УГЛЕРОДА** делятся на:

1. **Автотрофы** (литотрофы) добывают C из углекислоты и минералов. Это сапрофиты почвы, воды, воздуха
2. **Гетеротрофы** (органотрофы) усваивают C из готовых органических веществ:
 - **Сапрофиты**
 - **Паразиты (паратрофы)**

По усвоению **АЗОТА** гетеротрофы делятся:

1. Ассимилируют из воздуха;
2. Ассимилируют из аммонийных солей;
3. Ассимилируют из аммонийных солей в присутствии аминокислот и пуринов;
4. Ассимилируют в присутствии факторов роста
5. Нуждаются в сложных питательных средах

Ферменты бактерий

Питание БК – сложный процесс (ферментативные реакции), сочетающий катаболизм – приводящий к расщеплению крупных молекул на более простые соединения с высвобождением энергии, и анаболизм (конструктивный метаболизм) – приводящий к увеличению массы тела и потреблению энергии)

- *Эндoferменты и экзоферменты*
- **Конститутивные** (*существуют и в отсутствии субстрата*)
- **Индукцибельные** (*образуются при наличии субстрата*)
- **Репрессибельные** (*их синтез подавляется при избытке субстрата*)

Классы ферментов

- *Оксидоредуктазы* (окислительно-восстановительные);
- *Трансферазы* (перенос радикалов и атомов);
- *Гидролазы* (расщепляют вещества на более простые с присоединением воды);
- *Лиазы* (отщепляют от субстратов химические группы, не используя воду);
- *Изомеразы* (превращают субстрат в изомеры);
- *Лигаза-синтетазы* (ускоряют синтез сложных соединений).

Ферментативная активность – **«ПЕСТРЫЙ РЯД»**

Механизмы питания

Поступление питательных веществ в БК – сложный физико-химический процесс, зависящий от концентрации питательных веществ в БК и вне ее, проницаемости клеточной оболочки, прежде всего ЦПМ, особенностей внешней среды и т.д.

1. Проникновение веществ:

- **Активный перенос** (концентрация веществ в БК выше, чем в окружающей среде) – расход энергии (АТФ);
- **Пассивная диффузия** (концентрация веществ в окружающей среде выше, чем в БК) – энергия не расходуется;
- **Облегченная диффузия** – энергия не расходуется;
- **Транслокация радикалов** – участвуют ферменты пермеазы

2. Выход веществ из БК

- **Пассивная диффузия**
- **Облегченная диффузия**

Дыхание бактерий

- Процесс дыхания (биологического окисления) – все реакции, которые служат образованию энергии (АТФ). Это химические реакции, идущие с выделением тепла (энергетический метаболизм).
 - По типу дыхания все микробы делятся на 2 основные группы: **аэробы и анаэробы**.
1. **Аэробный тип** – обеспечивается кислородом воздуха и сред. Выделяется много энергии.
Пример: окисление глюкозы:
 $C_6H_{12}O_6 + 6CO_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 688 \text{ ккал}$
 - Выращивание без приспособлений;
 - Непрерывное культивирование;
 - В глубине бульона;
 - Аэрирование (качалка).
 2. **Анаэробный тип – брожение**. Реакция молекулярного расщепления органических и неорганических соединений. Выделяется мало энергии.

Пример. Расщепление глюкозы дрожжами:



Облигатный и факультативный

Дыхание бактерий

В зависимости от потребностей в кислороде бактерии делятся на:

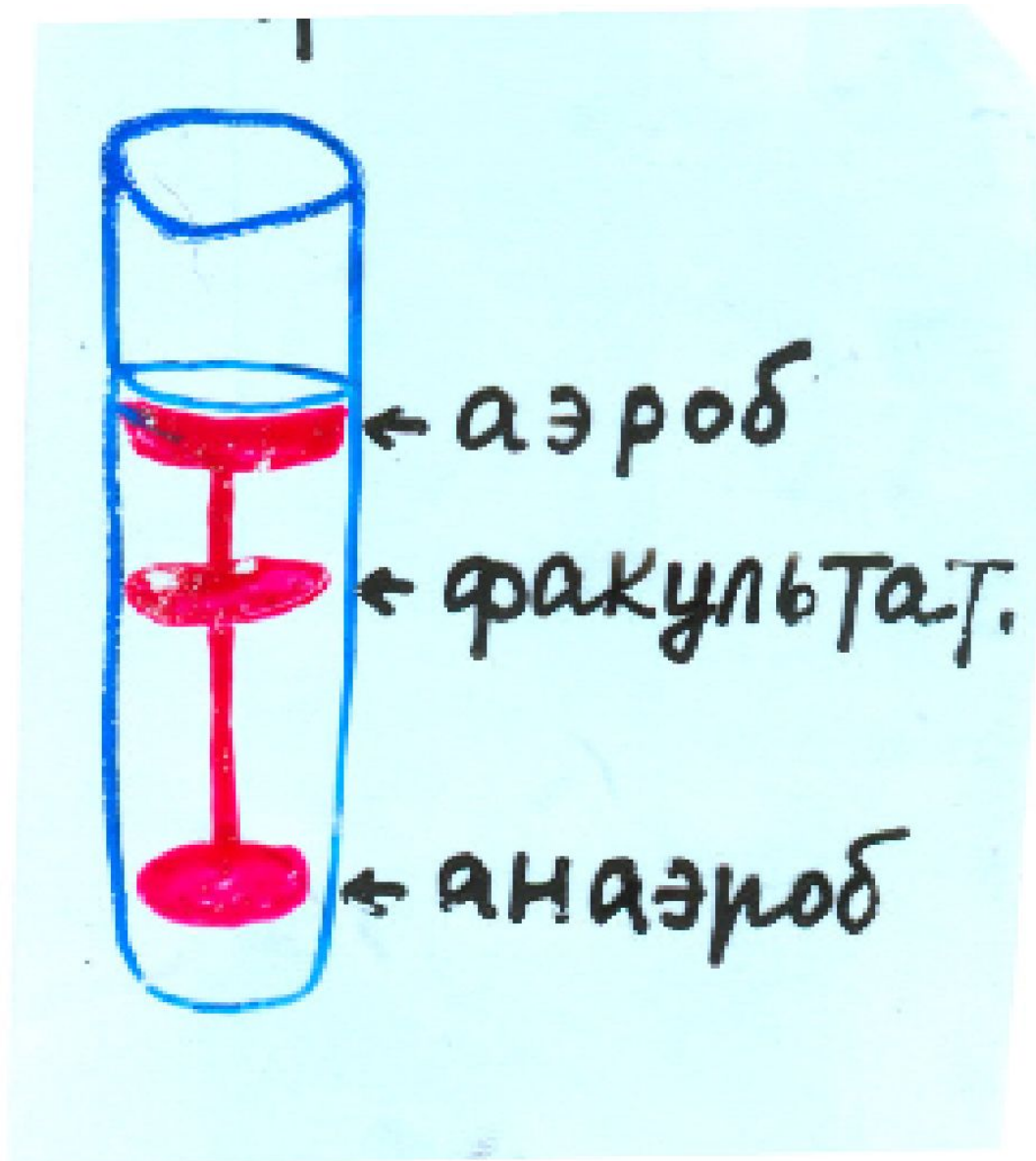
- **Облигатные (строгие) аэробы** – используют в качестве акцептора водорода лишь свободный кислород, снижение его содержания приводит к прекращению роста микробов; накопление перекиси водорода нейтрализуется ферментами каталазой, пероксидазой, супероксиддисмутазой (туберкулезная, дифтерийная палочки, холерный вибрион);
- **Облигатные (строгие) анаэробы** – растут только в бескислородной среде, не имеют фермента каталазы, разрушающего перекись водорода, накапливающуюся в присутствии кислорода и оказывающую бактерицидное действие на анаэробы (возбудители ботулизма, столбняка и т.д.); для анаэробов O_2 – яд!!! Нет фермента каталазы, нейтрализующего H_2O_2 , образующуюся в присутствии O_2 .
- **Факультативные анаэробы** – растут как в присутствии кислорода, так и без него (большинство бактерий – дизентерийная, брюшнотифозная палочки, стафилококки и стрептококки и др.)
- ***Микроаэрофилы (капнофилы)*** – лучше растут при повышенном содержании CO_2 и сниженном содержании кислорода (кампилобактерии и др.).

Аэротолерантность облигатных анаэробов – их способность сохранять жизнеспособность в присутствии кислорода.

Выращивание анаэробов

- **Анаэростаты** – специальные аппараты (откачивается атмосферный воздух, закачивается инертный газ, или смесь азота с углекислым газом, или бытовой газ);
- **Специальные газовые пакеты (Gas-pak)**, наполненные газом с чашками Петри с готовой питательной средой);
- **Посев уколом в полужидкий агар** или тиогликолатную среду;
- **Посев на среду Китт-Тароцци** – глюкозный бульон с добавлением кусочков печени(фарш, яичный белок, вата, пластиковые нити) для адсорбции кислорода, после посева среду заливают слоем стерильного вазелинового масла (преграда для O₂)
- **Метод Вильяля-Вейона** – расплавленный и остуженный (43-45°C) агар с засеянным материалом набирают в стеклянные трубки с запаянными концами и выращивают в термостате.
- **Биологический метод Фортнера.**

Посев уколом в полужидкий агар



Окислительно-восстановительный (редокс) потенциал

- **Степень аэробности** микроорганизмов выражается величиной **окислительно-восстановительного (редокс) потенциала**.
- Обозначается символом **rH_2**
- В водном растворе, насыщенном O_2 $rH_2 = 41$;
- В водном растворе, насыщенном H_2 $rH_2 = 0$
- Шкала от 0 до 41 характеризует степень анаэробности:
 - **Облигатные анаэробы** - rH_2 не более 12 (3-5 размножение);
 - **Облигатные аэробы** - $rH_2 = 14-20$;
 - **Факультативные аэробы** - $rH_2 = 0-20$

Измеряется электрометрически с использованием окислительно-восстановительных красителей (метиленовый синий, толуидиновый синий, резозурин)

rH_2 – мера способности раствора отдавать или принимать электроны, т.е. окисляться или восстанавливаться. Измеряется в вольтах.

Два процесса (питание и дыхание) - единый комплекс, обеспечивающий существование микробов

Рост и размножение микробов

- **Рост** – одна из основных функций любой живой клетки.
- **В.Д. Тимаков** – «*Рост – это координированное воспроизведение всех клеточных компонентов и структур, ведущее в конечном итоге к увеличению массы клетки*». Есть и другие определения роста.
- Увеличение массы клетки не может быть бесконечным. По достижению определенного возраста клетка микроба *начинает делиться* (на 2 или более равноценные в биологическом отношении дочерние клетки или гетероморфное деление), т.е. размножаться.
- У одноклеточных организмов размножение ведет к увеличению числа индивидуумов, составляющих популяцию или культуру.
- Бактерии размножаются путем **простого** (чаще бинарного) **деления**. **Скорость деления – 20-30 минут.**
- Кишечная палочка – 16-20 мин.; стрептококк и клостридии – 15 мин.; S.typhi – 24 мин.; шигеллы – 35 мин.
- *Прокариоты делятся в 100 раз быстрее, чем эукариотическая клетка.*

Деление бактерий. Репликация ДНК

Деление бактерий состоит из ряда последовательных этапов.

Разделению и расхождению клеток предшествует ***удвоение ДНК нуклеоида, его репликация*** – самый важный и сложный процесс, который идет при помощи ферментов ДНК-полимераз 1, 2 и 3. Последний самый важный.

Различают три периода репликации ДНК бактерий:

1. **Инициация** – побуждение к началу репликации;
2. **Период синтеза** (элонгация);
3. ***Период терминации***

Механизм репликации ДНК и деления БК

1. О «**созревании**» бактерии сигнал идет **из цитоплазмы в ядро**;
2. В ядре (нуклеоиде) активизируется **ген-инициатор**. Он контролирует выработку **белка-инициатора**.
3. Белок –инициатор действует на **репликатор** (участок ДНК, прикрепленный к септной мезосоме).
4. Одна нить ДНК разрывается и спираль ДНК расплетается (помогают **«расплетающие» белки**).
5. Образуются 2 нити ДНК, каждая из которых служит матрицей для сборки комплементарной цепи.
6. В новой (дочерней) клетке есть нить «старой» ДНК и «новой» ДНК.
7. Синтезируются ЦПМ.
8. Формируется поперечная КС и две клетки (дочерние) разъединяются

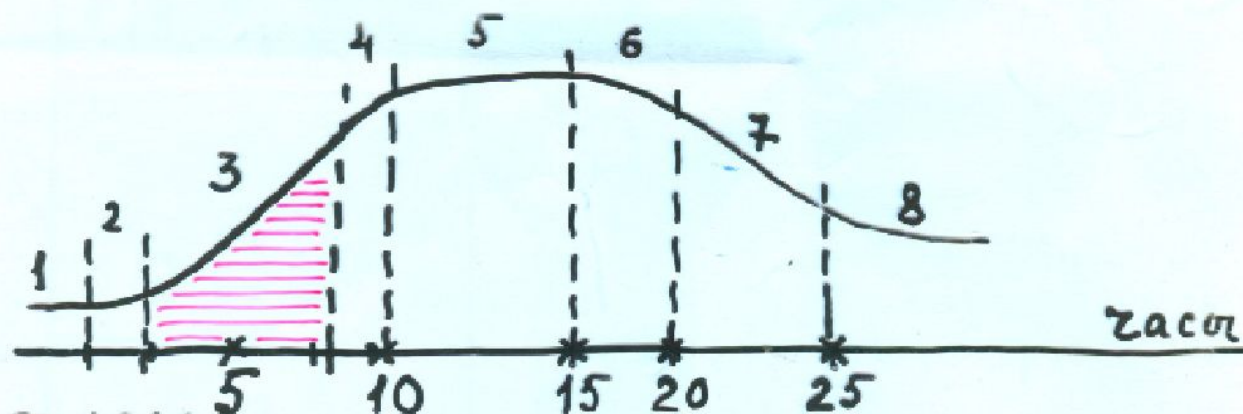
Размножение популяции микробов

- В ходе размножения популяции микробов – 2 параллельных процесса: **размножение и отмирание клеток.**

Размножение на плотных питательных средах.

- На плотных питательных средах – из одной БК образуются **скопления – колонии.**
- Колонии имеют разную величину, консистенцию, окраску, формы, характер поверхности и краев, характерные для определенного вида микробов (**идентификационный признак**).
- Особенности колоний зависят от взаимного расположения разделившихся клеток, от характера их «движения» после деления: если характер движения скользящий – то колония **гладкая (S - форма)**, если клетки располагаются под углом – поверхность **шероховатая (R-форма)**

Размножение на жидких питательных средах



ФАЗЫ:

1. Исходная (1-2 часа)
 2. Задержки размножения
 3. Экспоненциальная (5-6 часов)
 4. Отрицательного ускорения (2 часа)
 5. Стационарная (2 часа)
 6. Ускоренной гибели (3 часа)
 7. Логарифмической гибели (5 часов)
 8. Уменьшения скорости отмирания
- } лаг-фаза

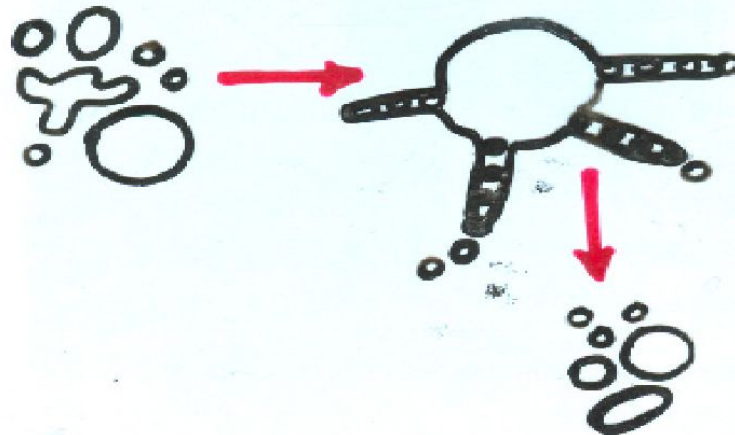
Размножение скотобактерий

СПИРОХЕТЫ
РИККЕТСИИ → поперечное деление

АКТИНОМИЦЕТЫ → фрагментация



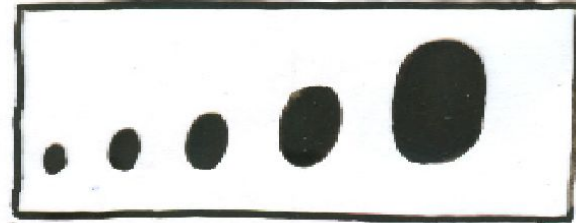
МИКОПЛАЗМЫ



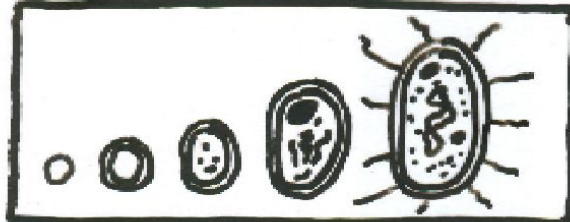
Развитие хламидий (цикл занимает 48 часов)



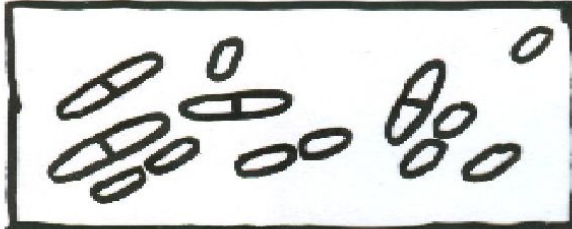
Рост, развитие, размножение БК, рост популяции



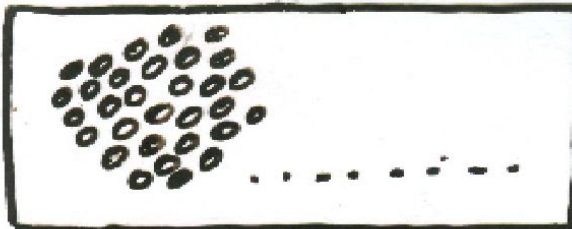
Рост



Развитие



Размно-
жение



Рост
популя-
ции

Питательные среды

- **Питательные среды** – *искусственные (или естественные) сбалансированные смеси питательных веществ, в определенных концентрациях и сочетаниях, способствующие росту и размножению микроорганизмов.*

Требования к ПС:

- должны быть **стерильными**;
- Должны содержать **необходимые питательные вещества, соли, ростовые факторы**;
- Должны иметь **оптимальную pH**;
- Должны **быть влажными**.

Классификация ПС:

- **Простые и сложные**;
- **Жидкие и плотные**;
- **Естественные, искусственные, синтетические**;
- **Основные и специальные – элективные (избирательные) и дифференциально-диагностические**

Некультивируемые формы бактерий (НФБ)

- Имеются **вегетативные** (не споровые) **формы грамотрицательных микробов**, сохраняющие жизнеспособность **без размножения**.
- Они получили название **НФБ**.
- При в исследуемом материале НФБ их не удается культивировать на питательных средах.
- Имеют эпидемиологическое значение, являясь **«невидимками»**, сохраняющими жизнеспособность в течение многих лет.
- Обнаружение НФБ – **полимеразная цепная реакция (ПЦР)**