

Казахский национальный медицинский
университет им. С.Д. Асфендиярова

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии

**Лекция №2:
«ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ
БАКТЕРИЙ»**

Лектор: Бармакова А.М.

ПЛАН ЛЕКЦИИ

1. Химический состав бактериальной клетки
2. Типы питания бактерий
3. Ферменты бактерий
4. Транспорт веществ в клетку
5. Метаболизм
6. Типы дыхания бактерий
7. Рост и способы размножения бактерий
8. Питательные среды
9. Методы культивирования анаэробов

Химический состав бактериальной клетки:

- Вода – от 70% до 90%
- Сухой остаток:
 - белки – 52%
 - углеводы – 17%
 - липиды – 9%
 - РНК – 16%
 - ДНК – 3%
 - мин.вещества – 3%

БЕЛКИ

БЕЛКИ

структурные

входят в состав клетки:

ЦПМ и ее производных

Клеточной стенки

жгутиков

спор

капсул

функциональные
(регуляторные)

ферменты

Различают ферменты:

I. ПО ЛОКАЛИЗАЦИИ:

- 1) **ЭНДОФЕРМЕНТЫ** - локализуются внутри клетки;
- 2) **ЭКЗОФЕРМЕНТЫ** - выделяются клеткой в окружающую среду.

II. ПО МЕХАНИЗМУ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ:

- 1) **конститутивные** – синтез ферментов происходит постоянно; не зависимо от наличия субстрата всегда содержатся в клетке определенных концентрациях;
- 2) **индуцибельные** – синтез фермента зависит от наличия соответствующего субстрата в среде

У бактерий обнаружены 7 основных классов ферментов:

1. **Оксидоредуктазы** – катализируют окислительно-восстановительные процессы
2. **Трансферразы** – осуществляют реакции переноса групп атомов
3. **Гидролазы** – осуществляют гидролитическое расщепление различных соединений
4. **Лиазы** – катализируют реакции отщепления от субстрата хим.группы негидролитическим путем с образованием двойной связи или присоединения хим.группы к двойным связям
5. **Лигаза** или **синтетаза** – обеспечивают соединение двух молекул, сопряженное с расщеплением пирофосфатной связи в молекуле АТФ или аналогичного трифосфата
6. **Изомеразы** – определяют пространственное расположение групп элементов.
7. **ДЕСМОЛАЗЫ** – участвуют в получении энергии в процессе дыхания

- **Ферментный состав клетки определяется геномом и является постоянным признаком. Знание биохимических свойств микроорганизмов позволяет идентифицировать их по набору ферментов. Основными продуктами ферментирования углеводов и белков являются:**
 - кислота;
 - газ;
 - индол;
 - сероводород и др.

Микробиологическая (рабочая) классификация ферментов:

1. Сахаролитические
2. Протеолитические
3. Аутолитические
4. Окислительно-восстановительные
5. Ферменты патогенности
(вирулентности)

УГЛЕВОДЫ

УГЛЕВОДЫ

Представлены в виде:

моносахаров

дисахаров

олигосахаров

полисахаров

Находятся в составе комплексных соединений:

белками

липидами

другими соединениями

ЛИПИДЫ

липиды
(жиры)

ЦПМ и ее производные

Клеточная стенка грам (-)
бактерий

Служат запасными веществами

В составе ЛПС формирует антигены

Входят в состав эндотоксина грам (-) бактерий

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

- Состоят из пуриновых и пиримидиновых оснований;
- РНК (рРНК – 80-85%, тРНК – 10%, мРНК – 1-2%);
- ДНК выполняет наследственную функцию
 - хромосомная (нуклеоид);
 - внехромосомные:
 - 1) плазмиды;
 - 2) транспозоны;
 - 3) IS-последовательности

Химические элементы, входящие в состав живой материи:

- **биогенные хим.элементы** – (C,O,N,H) – 95% сухого остатка, в т.ч. углерод-50%, кислород-20%, азот-15%, водород-10%.
- **макроэлементы** – (P,S,Cl,K,Mg,Ca,Na) – около 5%
- **микроэлементы** – (Fe,Cu,I,Co,Mo и др.) – доли процента, однако имеют важное значение в обменных процессах

МЕТАБОЛИЗМ

(обмен веществ и энергии):

1. **анаболизм** – (ассимиляция, конструктивный или пластический метаболизм) – синтез высокомолекулярных соединений для образования клеточных структур
2. **катаболизм** – (диссимиляция, энергетический метаболизм) – расщепление различных субстратов с целью получения энергии

Классификация бактерий по типу питания

- **1.АУТОТРОФЫ** (лат.autos-сам, trophe -питание) (литотрофы)-добывают С из углекислоты (СО₂) и минералов и не нуждаются в сложных органических соединениях. Это сапрофиты почвы, воды, воздуха
- **2.ГЕТЕРОТРОФЫ** (лат.geteros- питающийся за счет других) (органотрофы)- усваивают С из готовых органических веществ, используют разнообразные углеродсодержащие соединения - гексозы, многоатомные спирты, аминокислоты, орг. кислоты и реже углеводороды,
 - **-сапрофиты**
 - **-паразиты** (паратрофы)

3.ГИПОТРОФЫ – обеспечивают свою жизнедеятельность, реорганизуя клеточные структуры и метаболиты хозяина

4. АУКСОТРОФЫ – микроорганизмы (прихотливые микробы или с наследственными дефектами), не способные синтезировать углеводы, аминокислоты и т.д. Они ассимилируют эти соединения и др. факторы роста в готовом виде из окружающей среды или организма хозяина (человека, животного).Ауксотрофами чаще являются патогенные и УПМ.

Если ауксотрофия возникает в результате мутации, то «дикий» или основной тип, не нуждающийся в определенном факторе роста, называют прототрофами **ПРОТОТРОФЫ** - способны синтезировать все необходимые соединения из глюкозы и солей аммония

Классификация бактерий по источнику углерода

- **автотрофы** – используют CO_2 способны синтезировать все необходимые соединения
- **гетеротрофы** – неспособны полностью обеспечить собственный метаболизм и нуждаются в готовых углеродсодержащих соединениях
- **гипотрофы** – обеспечивают свою жизнедеятельность путем реорганизации клеточных структур и метаболитов хозяина. Крайняя степень утраты метаболической активности

Классификация бактерий по источнику энергии:

- **фототрофы** – получают энергию за счет фотосинтеза
- **хемотрофы** – получают энергию за счет окислительно-восстановительных реакций

Если при этом донорами электронов являются:

- ▣ органические соединения, то это – **хемоорганотрофы**
- ▣ неорганические соединения, то это – **хемотротрофы**

Классификация бактерий по источникам азота

- азотфиксирующие микроорганизмы – способны усваивать молекулярный азот из атмосферы; микроорганизмы, утилизирующие азот из:
 - органических соединений;
 - солей аммония – аммонифицирующие;
 - нитратов – нитратредуцирующие;
 - нитритов – нитритредуцирующие

БАКТЕРИИ:

- **-ГОЛОФИТЫ** - не способны захватывать твердофазные объекты и утилизируют пит. в-ва в виде относительно простых молекул в водных растворах
- **-ГОЛОЗОИ** - способны утилизировать «твердую пищу» с помощью внешнего питания, реализуемого вне клеток. Для этого имеется мощный ферментативный потенциал
- **ПРОТОТРОФЫ** - способны синтезировать все необходимые соединения из глюкозы и солей аммония

Механизмы поступления питательных веществ в клетку

- **пассивная диффузия** – энергонеизрасходующее, неспецифическое проникновение веществ в клетку по градиенту концентрации;
- **облегченная диффузия** – энергонеизрасходующее, субстратспецифическое проникновение веществ в клетку по градиенту концентрации с участием белков-переносчиков (пермеаз);
- **активный транспорт** – энергозатратный (за счет АТФ), субстратспецифичный (специальные связывающие белки в комплексе с пермеазами), вещества поступают в клетку против градиента концентрации в неизменном виде;
- **транслокация радикалов** – энергозатратный перенос веществ (в основном сахаров) в клетку в фосфорилированном (химически модифицированном) виде против градиента концентрации с помощью фосфотрансферной системы

СУЩНОСТЬ ПИТАНИЯ У МИКРООРГАНИЗМОВ-

- ф/х, б/х, эндотермические процессы, обеспечивающие синтез компонентов, необходимых для роста и размножения микробов.

МЕХАНИЗМ ПИТАНИЯ БАКТЕРИЙ (ФАЗЫ):

- - расщепление субстрата вне клетки (экзоферменты)
- - поступление веществ в клетку через всю ее поверхность
- - дополнительное расщепление веществ в клетке (эндоферменты)
- - синтез веществ в клетке
- - выведение продуктов обмена.

- **ОТЛИЧИЯ МЕХАНИЗМА ПИТАНИЯ ПРОСТЕЙШИХ ОТ ПИТАНИЯ БАКТЕРИЙ:**

-отсутствие у простейших первой фазы- экзогенного расщепления питательных веществ, которые захватываются в нативном состоянии (животный тип питания).

Дыхание микроорганизмов —
биологический процесс получения энергии. В
зависимости от того, что является конечным
акцептором электронов, выделяют:

По типу дыхания выделяют следующие группы микроорганизмов:

- 1. Облигатные аэробы** – растут и размножаются только в присутствии кислорода. Используют кислород для получения энергии путем окислительного фосфорилирования. Подразделяются на:
 - а) строгие аэробы** – растут при парциальном давлении атмосферы воздуха;
 - б) микроаэрофилы** – растут при пониженном парциальном давлении.
- 2. Облигатные анаэробы** – не используют кислород для роста и размножения. Получают энергию путем субстратного фосфорилирования. Подразделяются на:
 - а) строгие анаэробы** - молекулярный кислород для них токсичен: он убивает микроорганизмы или ограничивает их рост;
 - б) аэротолерантные** – могут существовать в атмосфере кислорода, не используя его для получения энергии.
- 3. Факультативные анаэробы** – способны расти и размножаться как в присутствии кислорода, так и в его отсутствии. Обладают смешанным типом метаболизма.

- **аэробное дыхание** – конечным акцептором электронов является молекулярный кислород (O_2);
- **анаэробное дыхание** - конечным акцептором электронов является связанный кислород ($-NO_3$), ($=SO_4$), ($=SO_3$)

МЕХАНИЗМ АНАЭРОБИОЗА

- Для анаэробов O_2 является ядом, так как при действии кислорода образуется H_2O_2 (перекись), которая и губит клетку. Гибель наступает из-за отсутствия у анаэробов каталазы и супероксиддисмутазы- ферментов, разрушающих H_2O_2 и супероксид –анион)
- АНАЭРОБЫ (микроаэрофилы) можно выращивать в аэробных условиях, если добавить в среду выращивания восстановители (акцепторы кислорода)- глюкозу, цистеин, сукцинат Na и пр.

Рост – согласованное необратимое воспроизведение всех клеточных компонентов и структур, ведущее к увеличению Массы клетки

Рост клетки не беспределен. После достижения критических размеров клетка подвергается делению (размножению)

Размножение бактерий – поперечное (бинарное) деление с образованием двух идентичных особей, ведущее к увеличению Числа клеток в популяции.

Фазы размножения бактерий

- 1. **ИСХОДНАЯ** (1-2 часа)-число бактериальных клеток не увеличивается, незначительный рост
- 2. **ЗАДЕРЖКИ размножения** (лаг-фаза) - период физиологического приспособления, включающего индукцию новых ферментов, синтез и сборку рибосом. Начало интенсивного роста клеток, но скорость деления невысокая
- 3. **ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНАЯ** (лог-фаза или логарифмическая) - максимальная скорость размножения клеток и увеличения числа бактериальной популяции в геометрической прогрессии. (5-6 час). Время генерации зависит от вида микроба, например: для псевдомонад-14 мин, для туберкулезной палочки-24 час.
- 4. **ОТРИЦАТЕЛЬНОГО УСКОРЕНИЯ** (2 часа) - уменьшение активности бактериальных клеток и удлинение периода генерации за счет истощения питательных веществ в среде, накопления в ней продуктов метаболизма и старения культуры.
- 5. **СТАЦИОНАРНАЯ** (2 часа) – равновесие между количеством погибших и образующихся клеток и клеток, находящихся в состоянии покоя. Спорообразующие бактерии (бациллы, клостридии) способны переходить в стадию споруляции.
- 6. **УСКОРЕННОЙ гибели** (от нескольких часов до нескольких недель)
- 7. **ЛОГАРИФМИЧЕСКОЙ гибели** (3 часа)
- 8. фаза **УМЕНЬШЕНИЯ СКОРОСТИ ОТМИРАНИЯ**

Микробиологические питательные среды – это субстраты, предназначенные для культивирования (выращивания) микроорганизмов в лабораторных условиях

I. По происхождению:

1. естественные (натуральные) – неизменные нативные (природные) компоненты (сыворотка крови, яичный белок и т.д.);
2. искусственные – готовят из пищевых продуктов путем соответствующей обработки
3. синтетические – состоят из растворов химически чистых соединений в точно установленных дозировках

II. По составу:

1. простые
2. сложные

III. По консистенции:

1. жидкие
2. полужидкие – 0,3-0,7% агар-агара
3. плотные – 1,5-2% агар-агара

IV. По назначению:

1. основные или универсальные (МПА, МПБ)
2. специальные – сложные среды для требовательных микроорганизмов (Левенштейна-Йенсена)
3. элективные (пептонная вода, селенитовая среда, солевой агар)
4. дифференциально-диагностические (среда Гисса, Эндо, Левина, Плоскирева)

Требования к питательным средам

- содержать все необходимые для роста и размножения бактерий вещества в легкоусвояемой форме;
- иметь определенную рН;
- иметь достаточную влажность;
- быть по возможности прозрачными;
- быть стерильными

Культуральные свойства

I. На **жидких средах** рост:

- придонный в виде осадка (хлопьевидный, крошковатый, в виде комочка ваты);
- поверхностный в виде пленки (тонкая, нежная, чешуйчато-бородавчатая, рыхлая);
- диффузный в виде равномерного помутнения

II. На **плотных средах** рост в виде колоний разной консистенции (плотной, слизистой, сметанообразной, рыхлой), размеров (точечные - до 1 мм, мелкие – 1-2 мм, средние – 2-4 мм, крупные – более 4 мм), цвета (желтый, синий, красный, черный), запаха, формы (круглая, овальная, ветвистая), поверхности:

- **S-тип** – ровные, гладкие, блестящие, выпуклые;
- **R-тип** – шероховатые, исчерченные, матовые, неправильной формы

Культивирование микроорганизмов - это создание оптимальных условий для роста и размножения микроорганизмов.

**УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
БАКТЕРИЙ:**

- **-ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА**
- **-ОПТИМАЛЬНАЯ ТЕМПЕРАТУРА**
- **-АЭРОБНЫЕ ИЛИ АНАЭРОБНЫЕ УСЛОВИЯ**
- **-ВРЕМЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

Методы культивирования анаэробов

- Посев «уколом» в высокий столбик сахарного полужидкого агара
- Выращивание в анаэротатах – герметически закрытых сосудах путем:
 - механического удаления воздуха с помощью вакуумного насоса;
 - химического поглощения кислорода пиригалоолом, гидросульфитом натрия, «ГазПак»;
 - замещения воздуха инертным газом (азот) или бескислородной газовой смесью (N_2 -85%, CO_2 -10%, H_2 -5%)
- Биологический метод **Фортнера** - совместное выращивание аэробов и анаэробов
- Метод **Венъям-Вейона** – разведенный исследуемый материал в пробирке с сахарным агаром насасывается в пастеровские пипетки с последующим запаиванием концов.
- Комбинированный метод – использование среды с кусочками внутренних органов, поглощающих и адсорбирующих на себя кислород

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ АНАЭРОБОВ:

- -КИТТА-ТАРОЦЦИ
- -ВИЛЬСОН-БЛЕРА
- -СРЕДА КОНТРОЛЯ СТЕРИЛЬНОСТИ
(СКС)
- -БЛАУРОКА

- УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ОБЛИГАТНЫХ ПАРАЗИТОВ (ВИРУСОВ, РИККЕТСИЙ, ХЛАМИДИЙ)

-ТОЛЬКО В ЖИВОЙ КЛЕТКЕ

- МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ОБЛИГАТНЫХ ПАРАЗИТОВ (ВИРУСОВ, РИККЕТСИЙ, ХЛАМИДИЙ)

- В ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНЫХ

-В КУРИНОМ ЭМБРИОНЕ

-В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

Этапы бактериологического
(вирусологического метода диагностики):

- -выделение ЧК микроорганизмов
- -идентификация ЧК микроорганизмов
- ПРИНЦИПЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧК БАКТЕРИЙ:
- -МЕХАНИЧЕСКОЕ РАЗОБЩЕНИЕ
МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ПОСЕВЕ
- - ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧК, ОСНОВАННЫЕ НА МЕХАНИЧЕСКОМ РАЗОБЩЕНИИ ПРИ ПОСЕВЕ:

- -МЕТОД ДРИГАЛЬСКОГО
- -ПОСЕВ ПЕТЛЕЙ (ШТРИХАМИ)
- -МЕТОД СЕКТОРНЫХ ПОСЕВОВ (ПО Gould)



МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧК, ОСНОВАННЫЕ НА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ МИКРООРГАНИЗМОВ:

- -ВЫДЕЛЕНИЕ ПОДВИЖНЫХ БАКТЕРИЙ (МЕТОД ШУКЕВИЧА-посев в конденсационную воду)
- -ВЫДЕЛЕНИЕ СПРОООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ (прогревание исследуемого материала)
- -ВЫДЕЛЕНИЕ КИСЛОТОУСТОЙЧИВЫХ БАКТЕРИЙ (обработка исследуемого материала кислотой)
- - ВЫДЕЛЕНИЕ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА (заражение животных)
- - ВЫДЕЛЕНИЕ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

- МЕТОДЫ СОЗДАНИЯ АНАЭРОБНЫХ УСЛОВИЙ:
- - **ФИЗИЧЕСКИЙ** (механическое удаление воздуха)
- - **ХИМИЧЕСКИЙ** (поглощение кислорода веществами –пирогаллол, тиогликолевая кислота, гидросульфит натрия)
- - **БИОЛОГИЧЕСКИЙ** (совместное выращивание анаэробов и аэробов –метод Пастера)
- - **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СПЕЦИАЛЬНЫХ СРЕД** (Китта-Тароцци, Вильсон - Блера, СКС и т.д)

ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
МИКРООРГАНИЗМОВ:

- -ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В
БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОМ
(ВИРУСОЛОГИЧЕСКОМ) МЕТОДЕ
- - В БИОТЕХНОЛОГИИ

Рост микробов на питательных средах

