

ГБОУ ВПО ТИХООКЕАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ МЗ РФ

Кафедра микробиологии и вирусологии

Физиология микроорганизмов, их химический
состав, питание и его обеспечение в
лабораторных условиях, дыхание,
размножение. Микробиологический метод
исследования.

д.м.н., проф. Шаркова В.

А.

1. Типы энергетического метаболизма
2. Дыхание МКО. Способы создания анаэробных условий
3. Размножение МКО, фазы роста бактерий, оценка роста
4. **Выделения чистой культуры (этапы, параметры идентификации)**



1. Какова цель культивирования микробов?
2. Каковы этапы выделения чистой культуры и параметры идентификации микробного вида?

=



Энергетический метаболизм

На строительные процессы необходима Е. Энергия в бактериальной клетке накапливается в виде АТФ

У хемоорганотрофных бактерий реакции, связанные с получением Е – это реакции окисления-восстановления, сопряженные с реакциями фосфорилирования. Окисленный в этих реакциях С выделяется в виде CO_2 .

Для удаления отщепившегося в этих реакциях водорода (в форме восстановленного НАД) различные бактерии используют различные возможности в зависимости от конечного акцептора водорода (или электронов)

В зависимости от способа получения Е у бактерий 3 типа метаболизма

Типы
метаболизма
по способу
получения Е

Окислительный
(оксидативный)
или дыхание

Ферментативный
(бродильный)

Смешанный

Ферментация (или брожение) – процесс получения H_2 , при котором отщепленный от субстрата водород переносится на органические соединения. Кислород в процессе брожения участия не принимает

Ферментировать могут углеводы, АК, пурины, пиримидины, многоатомные спирты

Не способны сбраживаться ароматические углеводороды, стероиды, каротиноиды, жирные кислоты

Исходя из природы конечных продуктов, различают несколько типов ферментации углеводов

- **Спиртовое брожение** – встречается у дрожжей (конечный продукт – этанол и CO_2)
- **Молочнокислое брожение** (2 типа):
 - **гомоферментативный тип** (один продукт – молочная кислота): *E. faecalis*, *S. salivarius*, *Lactobacillus dulgaricus*, *L. lactis*
 - **гетероферментативный тип** (несколько продуктов-молочная, уксусная к-ты, дополнительно конечными продуктами м.б. CO_2 , этанол): *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*
- **Муравьинокислое брожение** – масляная к-та, ацетон, уксусная, капроновая и др. органические к-ты: анаэробные бактерии
- **пропионовокислое (пропионобактерии)**
- **маслянокислое (кlostридии)**
- **уксуснокислое**

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 ($-NO_3$, $=SO_4$, $=SO_3$):



O_2 Аэробное дыхание -донор водорода H_2O



- нитратное окисление NO_3 - (факультативные анаэробы) донор водорода N_2



- сульфатное окисление SO_4 - (облигатные анаэробы) донор водорода H_2S

По отношению к O_2 , по использованию его в процессе получения Е

МКО

аэробы

анаэробы

Факультативные
анаэробы

Аэробное дыхание – наиболее распространенный процесс среди комменсалов и патогенов

Молекулы АТФ образуются при окислительном фосфорилировании с участием цитохромоксидаз, флавинзависимых оксидаз и флавинзависимых дегидрогеназ, конечный акцептор электронов – молекулярный кислород

Аэробы нуждаются в свободном кислороде. Облигатные (строгие) аэробы - некоторые виды псевдомонад

```
graph TD; A[аэробы] --- B[Облигатные аэробы]; A --- C[микроаэрофилы]
```

аэробы

Облигатные
аэробы

микроаэрофилы

-Используют O_2 в процессах получения Е, но растут при его пониженном парциальном давлении, т.к. имеют ферменты (гидрогеназы), которые активны только при низких значениях O_2 и инактивируются при контакте с сильными окислителями

Анаэробное дыхание – терминальными акцепторами электронов выступают соединения, содержащие «связанный кислород» (нитраты, нитриты, сульфаты, карбонаты, др.)

Облигатные анаэробы не используют O для получения E , молекулярный O токсичен: убивает или резко ограничивает рост МКО



Clostridium tetani

Факультативные анаэробы растут и размножаются в присутствии кислорода или без него. Они образуют АТФ при окислительном и субстратном фосфорилировании, способны переключаться с окисления на ферментацию (энтеробактерии)



B. anthracis

Аэротолерантные факультативно-анаэробные бактерии растут в присутствии кислорода, но энергию получают с помощью брожения – гетероферментативным молочнокислым брожением (молочнокислые бактерии)

Lactobacterium acidophilum



Аэробное дыхание энергетически более эффективно (синтезируется большее количество АТФ)



ферменты обмена:

- Оксиредуктазы- катализируют окислительно-восстановительные реакции
- Трансферазы- осуществляют реакции переноса групп атомов
- Гидролазы - гидролитическое расщепление различных соединений
- Лиазы -катализируют реакции отщепления от субстрата химической группы негидролитическим путем с образованием двойной связи или присоединения химической группы к двойным связям.
- Изомеразы- определяют пространственное расположение групп элементов
- Лигаза или синтетаза- обеспечивают соединение двух молекул, сопряженное с расщеплением пирофосфатной связи в молекуле АТФ или аналогичного трифосфата.

Наличие ферментов

аэробы

анаэробы

дегидрогеназы

Супероксид-
дисмутаза

каталаза

Пероксидаза-
аэротолерант

оксидаза

В процессе аэробного дыхания образуются токсические продукты окисления (H_2O_2 , $-O_2$ - свободные кислородные радикалы), от которых защищают ферменты: каталаза, пероксидаза, пероксиддисмутаза. у анаэробов эти ферменты отсутствуют, также как и система регуляции окислительно-восстановительного потенциала (rH_2).

Флавиновые и
пиридиновые
дегидрогеназы

нет

нет

нет

нет

Для культивирования строгих анаэробов создаются условия, позволяющие удалить атмосферный O_2 (механические, химические, биологические)

□ Приборы: анаэроостаты, анаэробные боксы (удаление воздуха, затем заполнение емкости инертным газом), CO_2 инкубаторы, эксикаторы со свечой



• система “Газпак” со специальными газорегенерирующими пакетами, действующими по принципу вытеснения атмосферного воздуха газовыми смесями в герметически закрытых емкостях

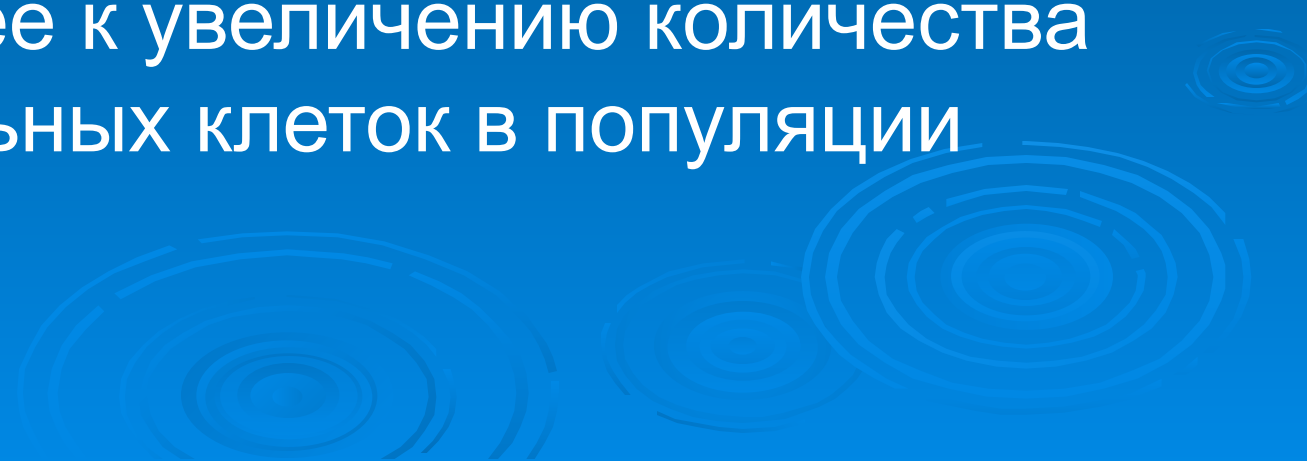


- добавление в питательные среды редуцирующих O_2 в-в (тиогликолят натрия, цистеин, аскорбиновая кислота, сульфиды, кусочки паринхиматозных органов, сахара)
- кипячение сред
- использование поглотителей O_2 (щелочной пирогаллол)



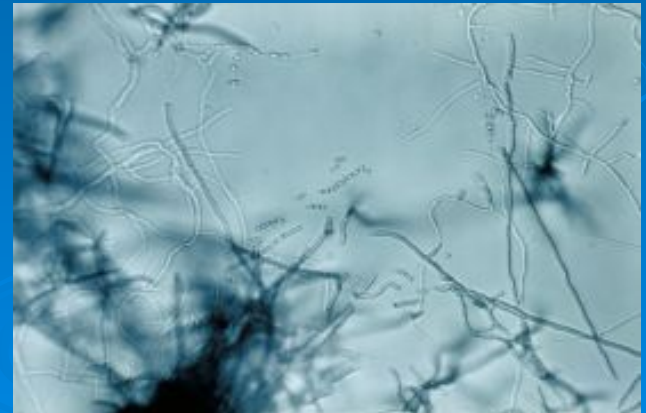
Рост бактерий – это формирование структурно-функциональных компонентов клетки и увеличение самой бактериальной клетки

Размножение – самовоспроизведение, приводящее к увеличению количества бактериальных клеток в популяции



- Бактерии размножаются бинарным делением пополам, реже почкованием
- Актиномицеты, как и грибы могут размножаться спорами или путем фрагментации нитевидных клеток

Streptomyces spp. / Актиномицеты



- Бактерии, заселяющие питательную среду, размножаясь, истощают среду, и рост бактерий прекращается. Такая культура наз. Периодической
- Непрерывный рост – при непрерывной подаче свежей питательной среды



■ Лаг-фаза – период между посевом бактерий и началом их размножения.

Продолжительность 4-5 час.

Бактерии увеличиваются в размерах, готовятся к делению, повышается количество НК, белка, др. компонентов кл-ки



Рис 3.13. Фазы роста бактерий

Оценка роста бактерий

Подсчет МКО производят:

- В камере Горяева ($n \times 2 \times 10^7$)
- Фотометрический метод (с применением стандарта мутности, измеряя способность бактериальной суспензии поглощать или рассеивать свет)
- Автоматические счетчики (регистрируется заряд поверхности каждой микробной кл-ки)

Счетчик колоний - прибор для подсчета количества живых клеток на плотной питательной среде (**КОЕ** – колониеобразующие единицы)



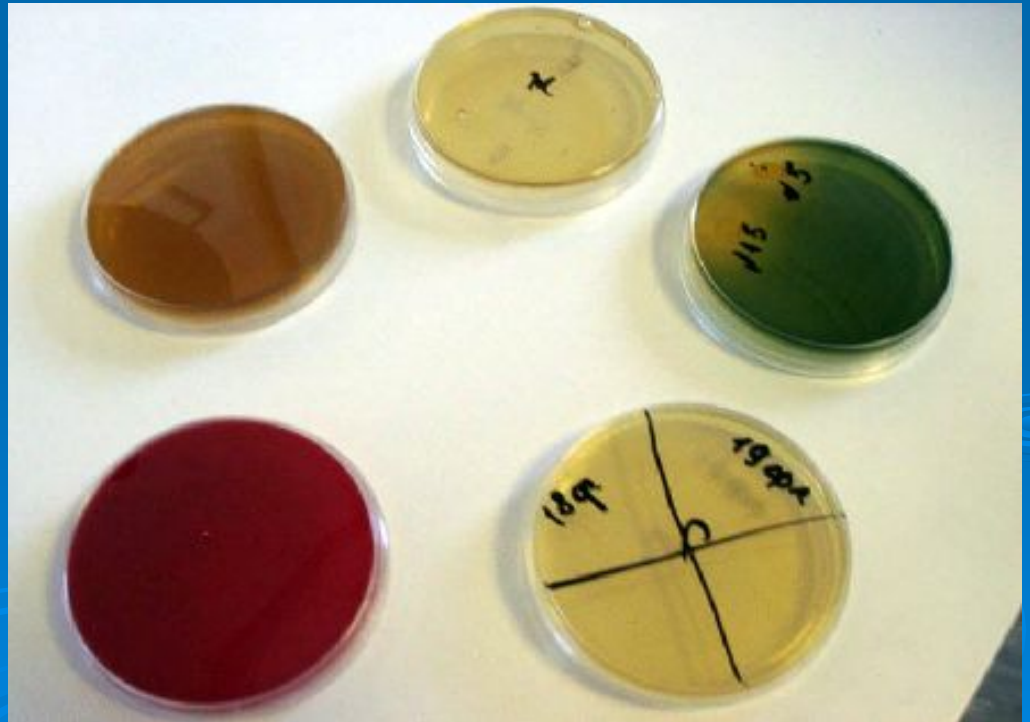
Культуральные свойства бактерий

- условия роста
- характер роста
- питательные потребности



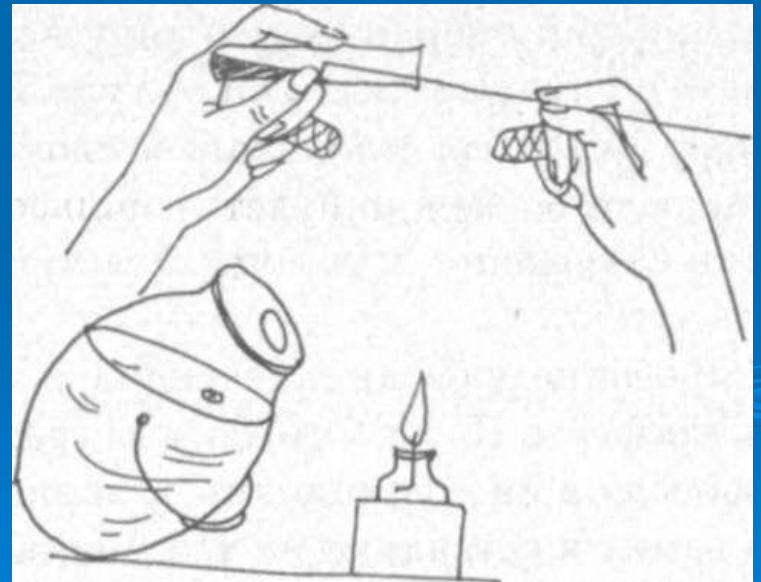
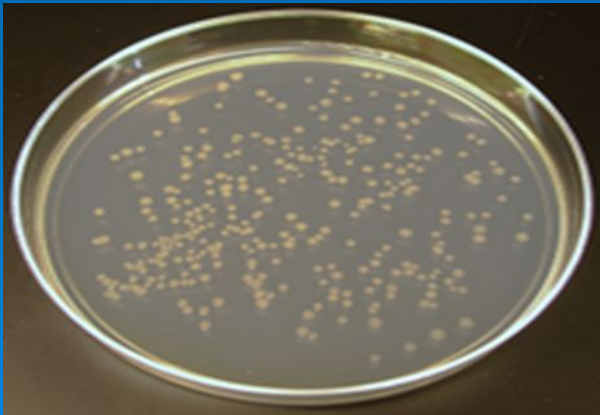
Цель исследования – идентификация микробного вида

- позволяет установить таксономическое
положение МКО (классифицировать МКО:
определить его род, вид, тип)



Выделение чистой культуры

- **Чистая культура** - скопление микробов одного вида на плотной или в жидкой питательной среде
- Чистые культуры получают из **изолированных колоний** - обособленных скоплений микробов на плотной среде



Этапы выделения чистой культуры

- накопление инфекционного материала
- получение изолированной колонии
- получение чистой культуры
- идентификация вида



Параметры идентификации

- морфология и тинкториальные свойства
- культуральные свойства МКО
- биохимическая активность
- антигенная характеристика
- фаготипирование
- факторы патогенности



Некультивируемые формы бактерий

Некоторые неспорообразующие бактерии переходят в некультивируемое состояние, чтобы пережить **неблагоприятные для размножения условия окружающей среды**: температура, концентрация солей, свет содержание O₂, питательных веществ.

Бактерии уменьшаются в размерах, приобретают сферическую форму. В таком состоянии бактерии сохраняют свою метаболическую активность, но не способны к непрерывному клеточному делению. Выявить бактерии в такой форме возможно с помощью ПЦР или специальным крашением

Методы выявления НФБ

- метод прямого подсчета жизнеспособных клеток
- к исследуемому материалу добавляют в небольшом количестве питательные вещества (дрожжевой экстракт) и налидиксовую кислоту (для подавления синтеза ДНК) на несколько часов
- Клетки усваивают питательные вещества и увеличиваются в размерах, но не делятся, поэтому такие увеличенные клетки четко видны в микроскоп и их легко подсчитать
- методы цитохимические (образование формазана)
- микроавторадиографии

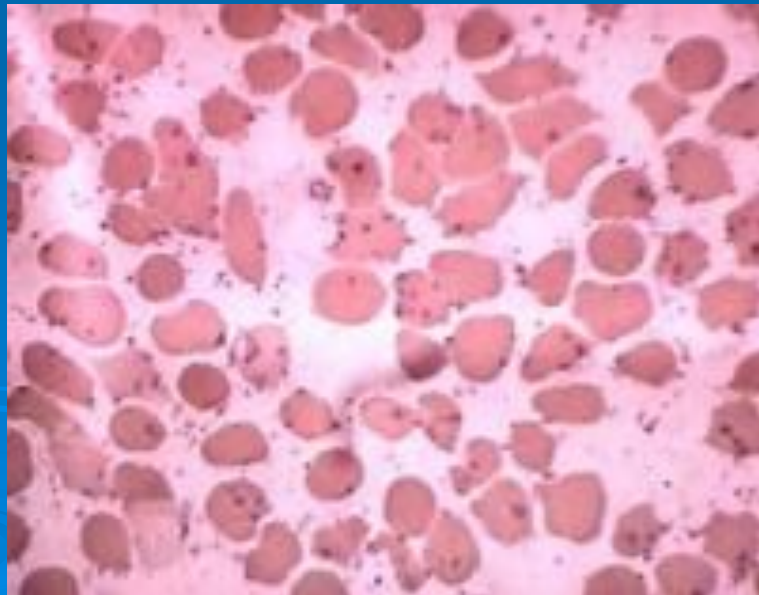


Фото С. Васильевой

Благодарю за внимание

