ГБОУ ВПО «ТИХООКЕАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ» МЗ РФ
Кафедра микробиологии и вирусологии

Физиология микроорганизмов, их химический состав, питание и его обеспечение в лабораторных условиях. Стерилизация, дезинфекция, контроль их качества

д.м.н., проф. Шаркова В. А.

1. Химический состав бактерий (белки, углеводы, липиды, минералы, ферменты)
2. Особенности процесса питания МКО
3. Питательные среды , классификация
4. Стерилизация (методы, контроль)
5. *Дезинфекция (степень, типы, методы)*

1. В чем состоит основная особенность питания МКО?
2. Каково назначение питательных сред?

Физиология изучает жизненные функции МКО: **питание, дыхание, рост и размножение**

В основе физиологических функций лежит непрерывный обмен веществ - **метаболизм**

Сущность обмена веществ

анаболизм (ассимиляция или пластический обмен)

Усвоение питательных веществ и использование их для синтеза клеточных структур

катаболизм (диссимиляция или энергетический метаболизм)

Питательные вещества разлагаются, окисляются с выделением энергии для жизни МКО

В результате распада питательных веществ происходит расщепление сложных органических соединений на простые низкомолекулярные

ферменты

Часть из них выводится из клетки, часть используется клеткой для биосинтетических реакций и включаются в процессы ассимиляции

Среды питательные

Анаболизм — совокупность процессов биосинтеза органических веществ, компонентов клетки и других структур органов и тканей. Анаболизм обеспечивает рост, развитие, обновление биологических структур, а также непрерывный ресинтез макроэргических соединений и их накопление

Катаболизм —совокупность процессов расщепления сложных молекул, компонентов клеток, органов и тканей до простых веществ (с использованием части из них в качестве предшественников биосинтеза) и до конечных продуктов метаболизма (с образованием макроэргических и восстановленных соединений)

Взаимосвязь процессов катаболизма и анаболизма основывается на единстве биохимических превращений, обеспечивающих энергией все процессы жизнедеятельности и **постоянное обновление тканей организма**

Химический состав бактерий

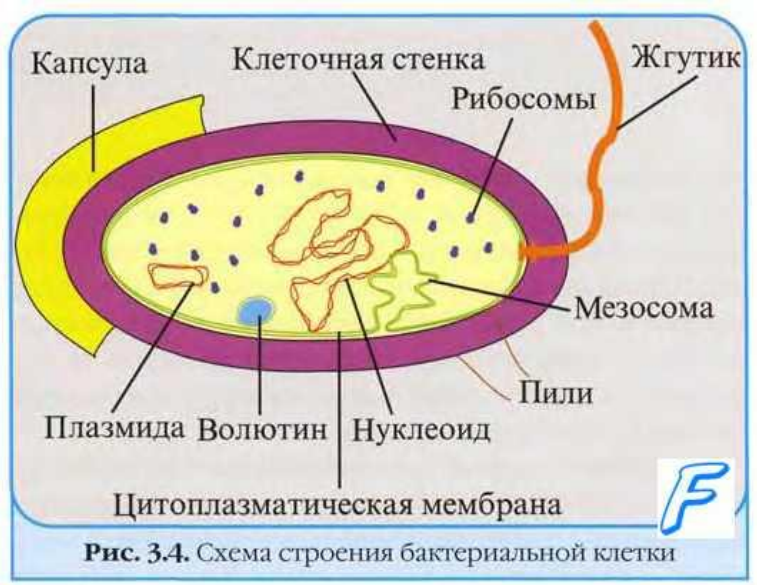


Рис. 3.4. Схема строения бактериальной клетки

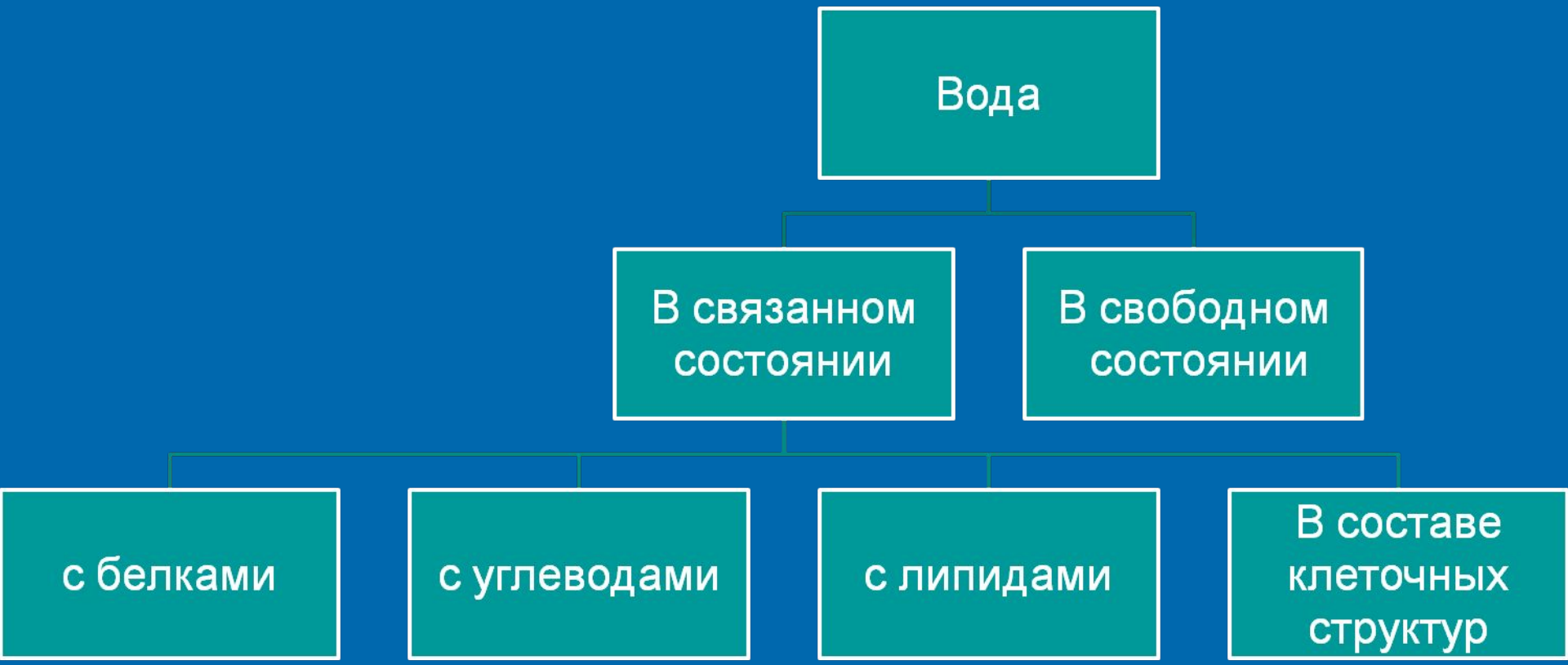
Химический состав

Сухое вещество (15-25%)

Вода (75-85%)

Органогены (C, H_2, O_2, N)

Минеральные элементы



свободная вода (СВ) принимает участие в химических реакциях клетки, является растворителем химических соединений, служит дисперсной средой для коллоидов

Содержание СВ изменяется в зависимости от условий внешней среды, физиологического состояния клетки, возраста

- белки
  - сложные (протеиды)
    - нуклео-протеиды
    - липо-протеиды
    - глико-протеиды
  - простые (протеины)

НП – соединение белка с НК (ДНК, РНК).
Белки распределены в цитоплазме, нуклеоиде, входят в состав клеточной стенки
К белкам принадлежат ферменты, токсины

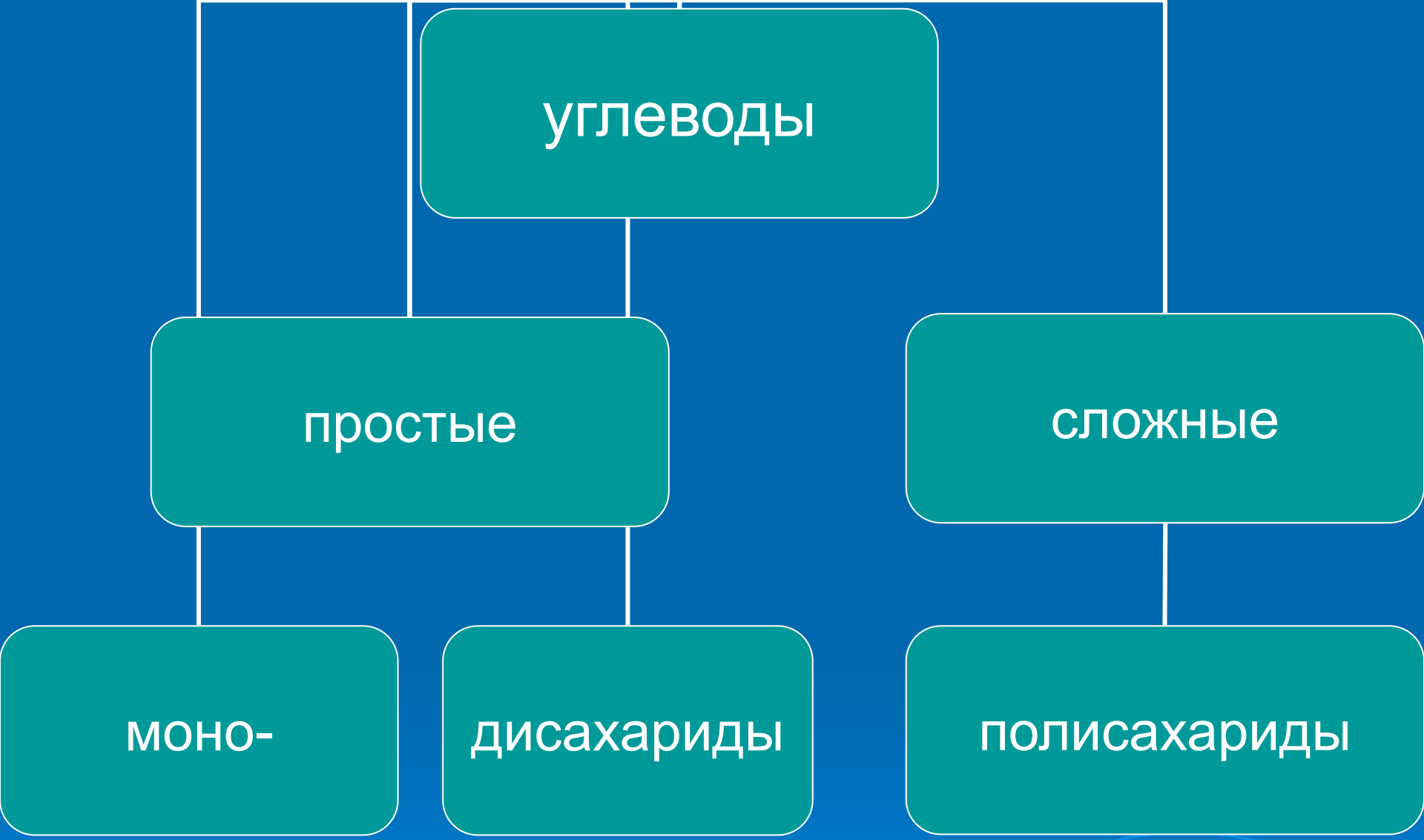
Нуклеиновые кислоты
ДНК
РНК
Содержится в нуклеоиде, плазмидах
В рибосомах
Обусловливает генетические свойства МКО
Принимает участие в биосинтезе клеточных белков

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



12-18% сухого вещества. Используются МКО в качестве источника энергии и углерода. Распределены в клеточной оболочке, капсуле, др.

0,2-40% сухого вещества. Распределены в цитоплазматической мембране, клеточной стенке, включениях, м.б. связаны с углеводами и белками. Участвуют в энергетическом обмене

2-14% сухого вещества

F - входит в состав НК, фосфолипидов, ферментов, АТФ – аккумулятора Е в клетке

Na – участвует в поддержании осмотического давления в клетке

Mg – входит в состав рибонуклеината магния, локализованного на поверхности Гр- бактерий

Fe – содержится в дыхательных ферментах

МЭ - участвуют в синтезе и активации ферментов

Ферменты – в-ва белковой природы, вырабатываемые живой клеткой, специфические белковые катализаторы

Свойства ферментов

- **Специфичность действия** (каждый фермент реагирует с определенным химическим соединением, катализирует одну или близкие хим. реакции)
- **Активность зависит от t среды** (37-50 град.С), **pH** (7,2-7,4), др.

Ферментный состав МКО – достаточно постоянный признак

для дифференциации МКО по биохимическим свойствам основное значение часто имеют конечные продукты и результаты действия ферментов.

микробиологическая (рабочая) классификация ферментов

- Сахаролитические
- Протеолитические
- Аутолитические
- Окислительно- восстановительные
- Ферменты патогенности (вирулентности).

Особенности процесса питания МКО

- Поступление питательных веществ происходит через всю поверхность МКО
- Высокая скорость метаболических реакций

  (За сутки одна клетка перерабатывает питательных веществ в 30-40 раз больше собственной массы)
- МКО быстро адаптируются к изменяющимся условиям среды обитания

Способы питания

- **Голофитный** – утилизация питательных веществ происходит в водных растворах в виде простых молекул веществ
- **Голозойный** – способность заглатывать и переваривать плотные частички пищи за счет их гидролиза с помощью пищеварительных ферментов. Процесс происходит вне клетки. В результате образуются простые водорастворимые молекулы, проникающие через клеточную стенку и цитоплазму

Типы питания определяются по характеру усвоения C и N

Типы питания по характеру усвоения С

- **Литотрофы (Автотрофы)** – синтезируют сложные органические вещества из простых неорганических соединений (двуокись С или карбонаты). Способны расти в чисто минеральной среде

- **Органотрофы (Гетеротрофы)**– нуждаются в готовых органических соединениях (усваивают С из углеводов, многоатомных спиртов, органических кислот, АК)

  - **сапрофиты** (питаются мертвым органическим материалом, независимы от др. организмов)

  - **паразиты** (зависимы в получении питат. веществ от хозяина, м.б. облигатными, факультативными)

Типы питания по характеру усвоения N

- **Аминоавтотрофы** – для синтеза белка клетки используют молекулярный **N воздуха или усваивают его из аммонийных солей**
- **Аминогетеротрофы** – получают **N** из органических соединений – АК, сложных белков

Тип питания по источникам энергии

- **Фототрофы** - используют для биосинтетических реакций энергию солнечного света
- **Хемотрофы** – получают Е за счет окисления неорганических веществ и органических соединений

- **Гетерохемоорганотрофы, прототрофы** – МКО, у которых источник С является и источником Е

Факторы роста – вещества, которые микробом не синтезируются, получают в готовом виде, входят в состав ферментов, играют роль катализаторов в биохимических процессах:

- Витамины
- АК (для синтеза белка)
- Пуриновые и пиримидиновые основания (для построения НК)

Транспорт питательных веществ (осуществляется небольшими молекулами и в растворенном виде)

- **Пассивная диффузия** – по градиенту концентрации (С вещества и осмотическое Р по обе стороны выравниваются) – С вещ-ва в среде > С его в клетке
- **Облегченная диффузия** – с помощью пермеаз (молекулы-переносчика – фермент, локализованный на ЦПМ, обладает специфичностью) без затраты Е
- **Активный транспорт** – с участием пермеаз с затратой Е (С в-ва в кл-ке > С в среде)
- **Транслокация химических групп** – перенос радикалов (в-во подвергается химической модификации)

Выход в-в из МКО:

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

- **Питательные среды** – субстраты для культивирования МКО (осуществляются все жизненные процессы МКО: питание, дыхание, размножение и др.)

Требования, предъявляемые к ПС

- Быть питательными
- pH среды – оптимальной «С» водородных ионов
- Изотоничность
- Стерильность
- Влажность
- Унифицированными
- Обладание окислительно восстановительным потенциалом

Классификация ПС

По исходным компонентам

натуральные

синтетические

Животного происхождения

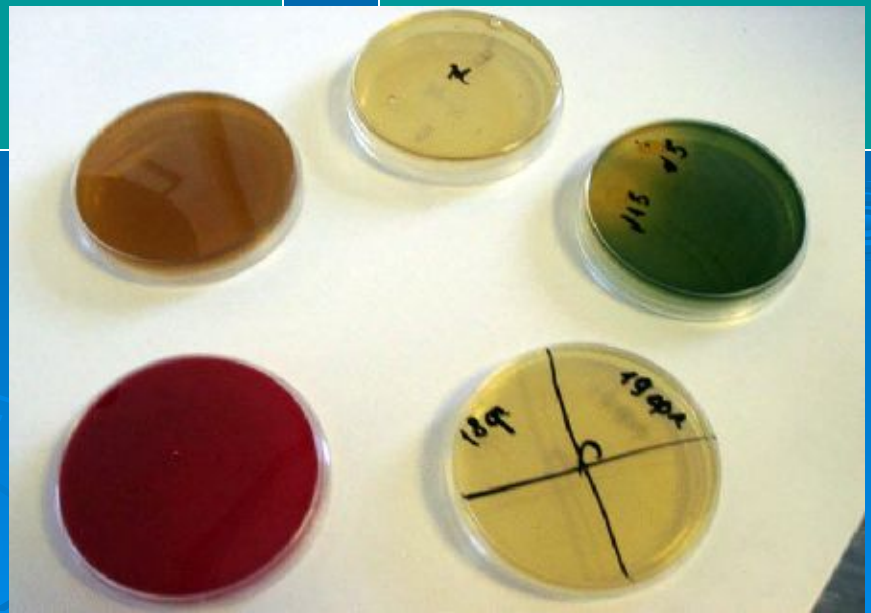
Растительного происхождения

По консистенции (степени плотности)

жидкие

плотные

полужидкие



Агар-агар, желатин

По составу

простые

МПА, МПБ, бульон и агар

Хоттингера, ПВ

сложные

Добавляют сыворотку,
кровь,
углеводы

По назначению

Элективные (избиратель-ные)

Накопления

ДДС (углеводолитические протеолитические гемолитические)

Консервирую-щие

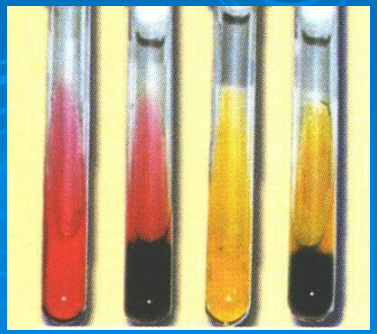
Среда Гисса

Среда Левина

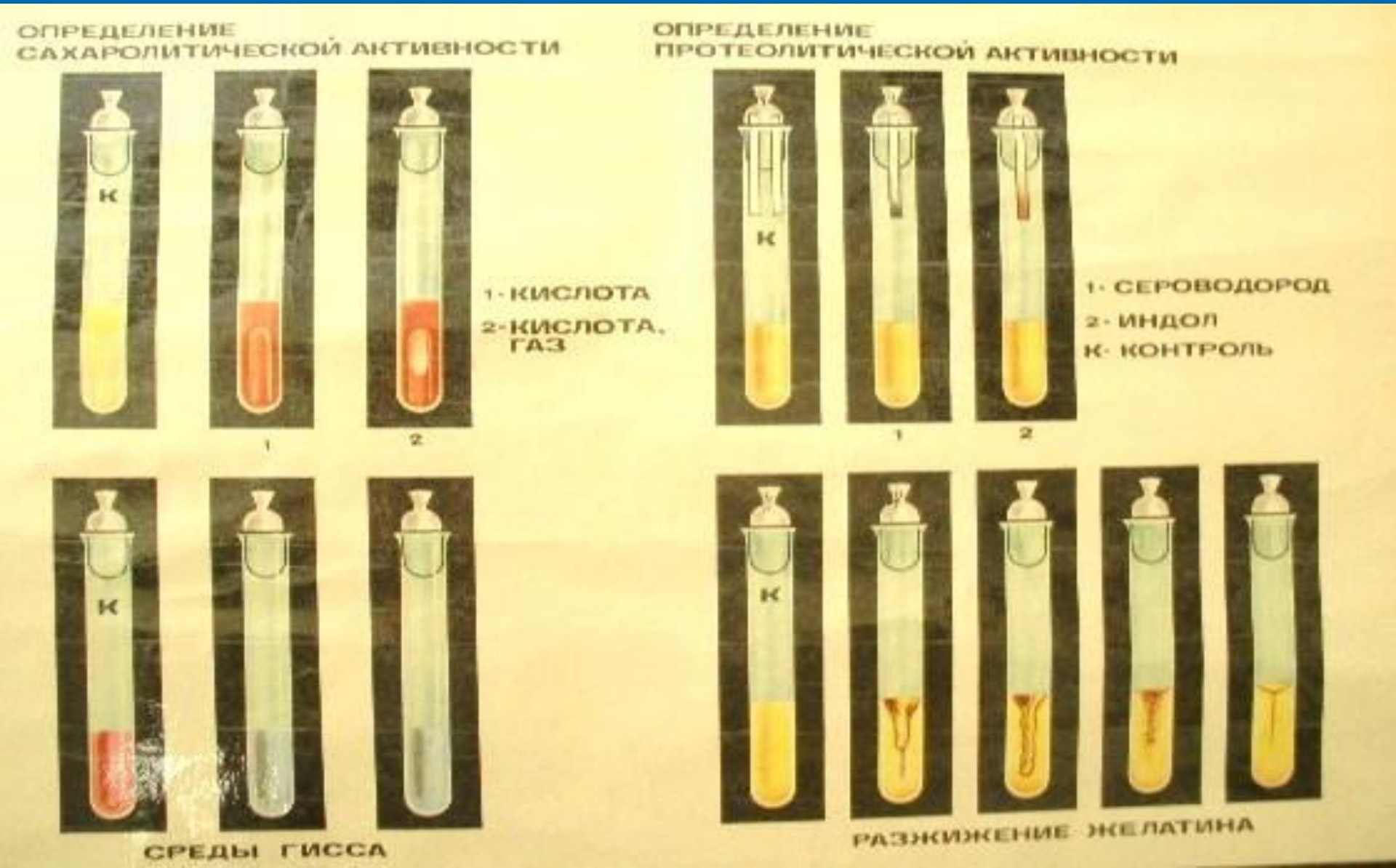
Висмут-сульфит агар

Среда Вильсон-Блера

Среда Олькеницкого (трехсахарная среда с мочевиной) - для накопления и дифференциации энтеробактерий



Биохимическая активность бактерий

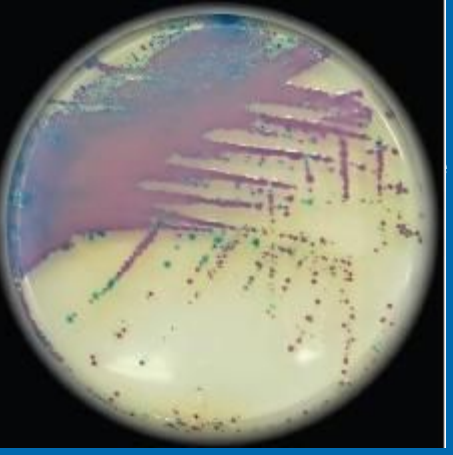


Колонии Legionella pneumophila на угольно-дрожжевом агаре

- Рост 3-5 суток

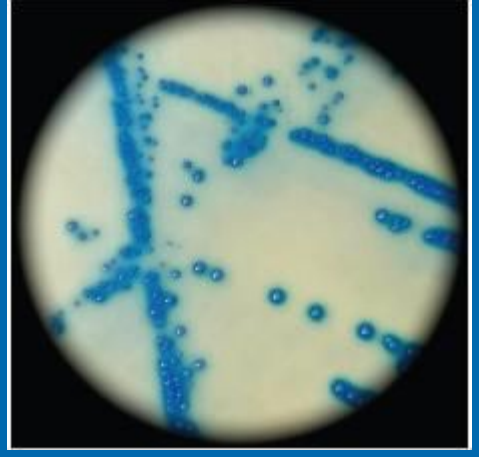
Хромогенные питательные среды – для выявления специфических или уникальных ферментов микроорганизмов

В состав среды включены хромогенные субстраты - вещества, при расщеплении которых образуются окрашенные продукты (+селективные добавки, подавляющие рост нежелательных бактерий)

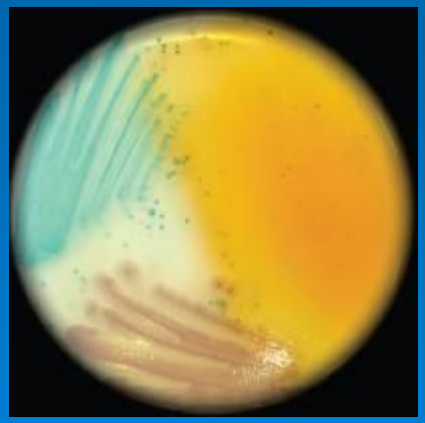


Хромогенная среда Coli/Coliform - для выделения и подсчета E. coli и колиформных бактерий

среда Candida - для выделения и дифферен-циации C. albicans, C. tropicalis, C. Krusei «Liofilchem» (Италия)



среда Strepto B - для выделения стрептококков группы B (Streptococcus agalactiae)



Хромогенная среда Detection
Позволяет одноэтапно и одновременно выделять и идентифицировать бактерии:

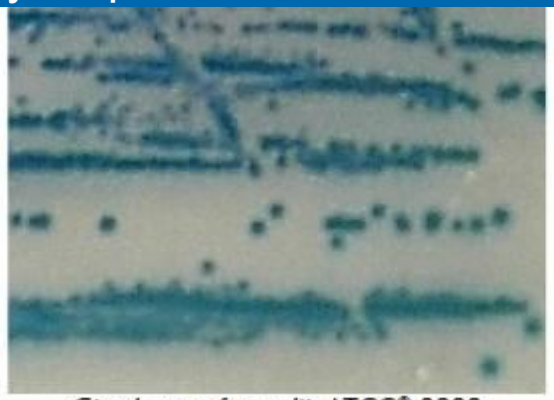
- E. coli
- Proteus mirabilis
- S.aureus
- Enterococcus faecalis
- Klebsiella pneumonia
- Pseudomonas aeruginosa

Хромогенная селективная питательная среда для выделения и дифференциации Salmonella spp.

Принцип:

Протеозный пептон и мясной экстракт обеспечивают наличие аминокислот и белков. Дрожжевой экстракт является источником аминокислот и витаминов группы В. Хлорид натрия поддерживает осмотический баланс среды. Специальная хромогенная смесь обеспечивает дифференциацию Salmonella spp. от других колиформных и неколиформных бактерий на основе цвета и морфологии колоний. Хромогенная смесь также ингибирует грамположительные микроорганизмы. Добавка

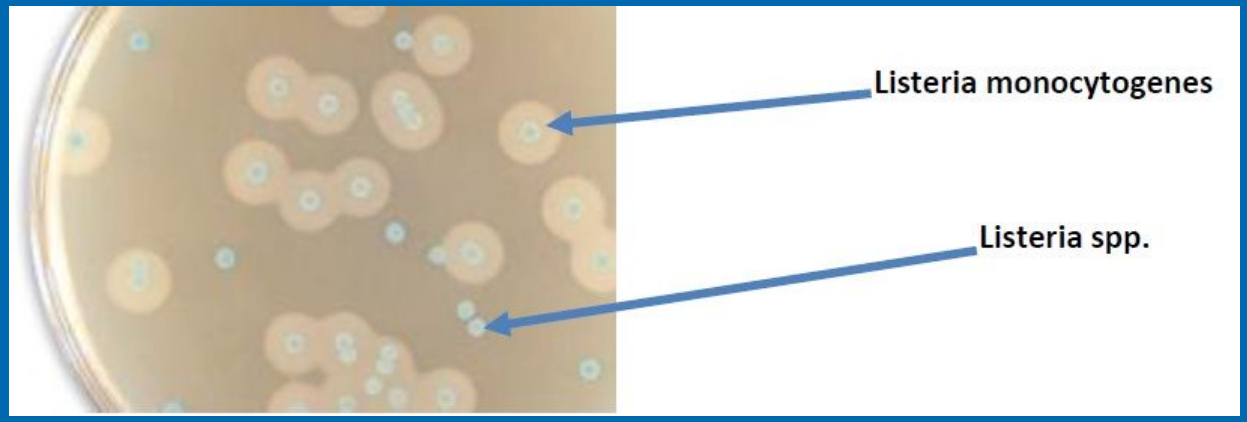
Salmonella typhimurium ATCC® 14028



Citrobacter freundii ATCC® 8090

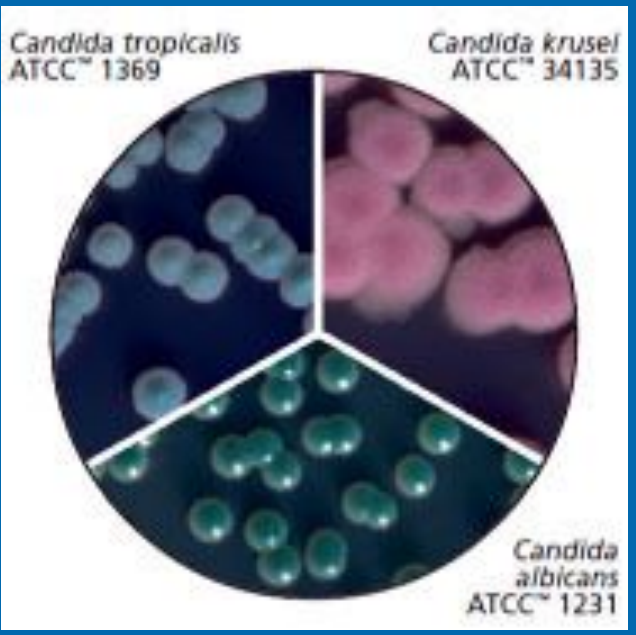
Salmonella enteritidis ATCC® 13076

Salmonella typhimurium и другие виды сальмонелл будут выявляться ростом окрашенных колоний розовато-лилового цвета. Citrobacter и другие колиформы - в виде сине-зеленых колоний. Некоторые МКО, которые не гидролизуют хромогенные смеси, могут давать рост в виде бесцветных колоний. Конечная идентификация может быть осуществлена с помощью биохимических и/или серологических тестов



Хромогенная среда O.A.LISTERIA AGAR
(Ottaviani Agosti)
Принцип:
Среда имеет селективные свойства благодаря хлориду лития и смеси антибиотиков, состоящей из цефтазидима, полимиксина B, налидиксовай кислоты и циклогексимида. Дифференциация происходит благодаря присутствию в среде хромогенной смеси X-глюкозида в качестве субстрата для детекции фермента β-глюкозидазы, общего для всех видов Listeria. Специфическая дифференциальная активность получена с помощью субстрата L-α-фосфатидилинозит для фермента фосфолипазы C, который продуцируют Listeria monocytogenes

Интерпретация результата:
Благодаря комбинации двух субстратов происходит дифференциация колоний Listeria spp., которые имеют сине-зеленый цвет, от колоний Listeria monocytogenes, которые имеют сине-зеленый цвет и окружены матовым ореолом



Хромогенные питательные среды, Becton Dickinson (Германия)
BD CHROMagarTM - хромагары для визуальной дифференциации микроорганизмов

CHROMagarTM Candida: среда для выделения и идентификации Candida albicans, C. tropicalis иC. krusei. Среда ингибирует рост бактерий и также может использоваться в качестве селективной среды для выделения других видов дрожжей и мицелиальных грибов

CHROMagarTM Orientation: среда для выделения, прямого определения, дифференцирования и подсчета патогенных микроорганизмов мочевыводящих путей. Позволяет дифференцировать и идентифицировать E. coli и Enterococcus spp без выполнения подтверждающего теста

CHROMagarTM Salmonella: селективная и дифференциальная среда для выделения и предварительной идентификации видов Salmonella

- **Стерилизация** (sterilitas – бесплодный) - обеззараживание, обеспложивание МКО в объектах внешней среды

Методы стерилизации

- **Механические или физические**

- автоклавирование

стерилизатор, предназначенный для стерилизации хирургических инструментов

ГПД-560-2 - автоклав для стерилизации водяным насыщенным паром под давлением

Методы стерилизации

- текучим паром (насыщенный высокотемпературный водяной пар в аппарате Коха)
- Жаром (сухим горячим воздухом в печах Пастера, t до 160 град.)

Методы стерилизации

- **лучевая стерилизация: ионизирующее излучение (гамма-излучением с пом. радиоактивных изотопов, электронным излучением с пом. ускорителя электронов)**
- **Фильтрование** через мелкопористые фильтры (керамические, асбестовые, стеклянные, мембранные ультрафильтры из коллоидных растворов нитроцеллюлозы)
- **тиндализация** (дробная стерилизация) – многократное прогревание на водяной бане

Методы стерилизации

- **Химические**
- **Химическими препаратами (антибиотики, смесь растворов)**
- **Газами (оксид этилен, смесь ОЭ и бромистого метила в соотношении 1:2,5 и формальдегида)**
- **плазма, озон**

Стерилизатор озоновый низкотемпературный "Озон СОН-1" на 30 л. Стерилизация производится **<u>озоно-воздушной смесью,</u>** могут **<u>повреждаться изделия из стали, меди, резины и др., озон токсичен.</u>**

Гласперленовый метод - стерилизация **небольших цельнометаллических инструментов, не имеющих полостей, каналов** и замковых частей: инструмент погружается в среду мелких **стеклянных шариков, нагретых до температуры 190 - 290С на 20 - 180 секунд.**

Плазменная стерилизация

- стерилизующий агент - **пары водного раствора пероксида водорода и низкотемпературная плазма** (ионизированный газ, образующийся при низком давлении)
- **Действуют фотонами ультрафиолетового излучения и радикалами (46 - 500С за 54 - 72 мин.)**

Не подлежат стерилизации плазмой изделия из полиамида, некоторые сульфиды, хирургическое белье, перевязочный материал, изделия из целлюлозы, порошки, жидкости

Режим стерилизации, выбор метода зависит от объекта стерилизации:

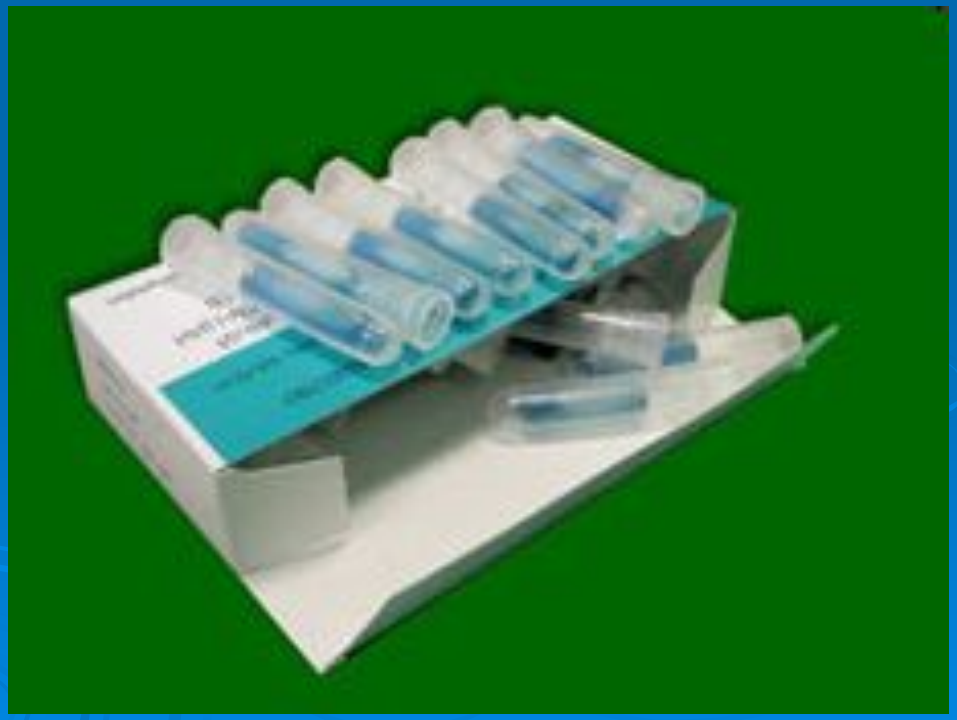
- Споры уничтожаются при 160-170град., 120 мин.
- перевязочный материал, питательные среды простые – 120 град. (1 атм), 20 мин.
- Жаром стерилизуют лабораторную посуду, инструменты (1 час)
- Сложные среды с углеводами, молоком, желатином – в аппарате Коха 100 град. 30-60 мин. 3 дня
- Белковые среды плотные – 58 град. 1 час 3 дня
- Белковые жидкие – водяная баня 58 град. 1 час 3-4 дня
- Стерилизация газами осуществляется в присутствии пара при 80град в камерах
- Лучевая стерилизация – в промышленных условиях при стерилизации большого числа предметов (шприцы, системы для переливания крови)
- Фильтрование – сыворотки крови, лекарственные жидкие препараты

Стерильность материалов, изделий, сроки сохранения

- закрытые биксы старого образца – 72 часа;
- закрытые биксы нового образца – 20 суток;
- при открытом биксе любого образца стерильность материалов, изделий сохраняется до 24 часов;
- крафт-пакеты, заклеенные – 20 суток;
- крафт пакеты на скрепках – 3 суток.
- При открытом крафт-пакете материалы и изделия должны быть использованы сразу

Контроль стерилизации

- Механический метод
- Химический
- Биологический



Контроль стерилизации

- Механический метод – визуальный и инструментальный контроль (показатели термометра, манометра)
- Химический – с помощью химических индикаторов, меняющих цвет или плавящихся при определенной t, влажности (антипирин, сахар, индикаторные бумажки, бензойная кислота, мочевина, запаянная в ампулы)

- **Биологический - смыв с объекта или сам объект – в термостат, биологические индикаторы стерилизации (БИ)**

БИ - препарат из патогенных спорообразующих микроорганизмов, с известной высокой устойчивостью к данному типу стерилизационного процесса

Дезинфекция (обеззараживание) **– совокупность полного уничтожения или снижения численности популяции потенциально патогенных для человека МКО на объектах внешней среды**

- **При этом споры, вирусы могут остаться в жизнеспособном состоянии**

степени дезинфекции

- **А степень - уничтожение аспорогенных форм бактерий, микоплазм, риккетсий, простейших**
- **В степень - уничтожение грибов, аспорогенных форм бактерий, характеризующихся повышенной устойчивостью**
- **Степень С – уничтожение возбудителей ООИ и вирусов**
- **Степень D – спор и цист простейших**

Типы дезинфекции

- **Текущая** – проводится в действующих эпид. очагах для снижения микробной контаминации

Цель – разорвать или затормозить процесс передачи возбудителя от источника инфекции к восприимчивым людям

- **Заключительная** – по окончании работы, после госпитализации больного

Цель – полное уничтожение возбудителя на всех объектах очага

Методы дезинфекции

- **Тепловой** – горячая вода, пар (100 град. 5 мин.), пастеризация (60-70 град., 20-30 мин.) убивают все вегетативные формы бактерий
- **химический** – 2% натрия гидрокарбоната (сода растворяет белки, жиры)
- **УФ-облучение** – бактерицидные лампы (длина волны 200-400 нм)

Методы дезинфекции медицинского инструментария

- погружение в 6%-ный раствор перекиси водорода на 60 мин или 4%-ный - 90 мин;
- 0,03%-ный раствор нейтрального анолита - экспозиция 30 мин;
- пресепт 0,056% - экспозиция 90 мин (10 таб. по 0,5 г);
- лизол 5% - экспозиция 15 мин (50 мл препарата + 960 мл воды);
- лизоформин 3000 1,5% - экспозиция 15 мин (20 мл препарата + 980 мл воды);
- виркон 1% - экспозиция 10 мин (10 г препарата + 980 мл воды);
- дезоформ - экспозиция 60 мин (10 мл препарата + 990 мл воды);
- дезоформ 3% - экспозиция 30 мин (30 мл препарата + 970 мл воды);
- дезоформ 5% - экспозиция 10 мин (50 мл препарата + 950 мл);
- глутарал 2% - экспозиция 15 мин;
- спирт 70%-ный - экспозиция 30 мин.

1. В чем состоит основная особенность питания МКО?
2. Каково назначение питательных сред?

Особенности процесса питания МКО

- Поступление питательных веществ происходит через всю поверхность МКО
- Высокая скорость метаболических реакций

  (За сутки одна клетка перерабатывает питательных веществ в 30-40 раз больше собственной массы)
- МКО быстро адаптируются к изменяющимся условиям среды обитания

Благодарю за внимание

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
- Лигазы или синтетазы- обеспечивают соединение двух молекул, сопряженное с расщеплением пирофосфатной связи в молекуле АТФ или аналогичного трифосфата.

В соответствии с механизмами генетического контроля у бактерий выделяют три группы ферментов

- **Конститутивные ф.** – синтез происходит ПОСТОЯННО (ферменты клеточного обмена -протеазы, липазы, карбогидразы, др.)
- **Индуктивные ф. (адаптивные)** – синтезируются в кл-ке под влиянием соответствующего субстрата, находящегося в питательной среде и, когда МКО вынужден его усваивать
- **Репрессибельные** - синтез которых подавляется избытком продукта реакции

- **Экзоферменты** – выделяются во внешнюю среду, осуществляют процессы расщепления высокомолекулярных органических
- **Эндоферменты -** участвуют в реакциях обмена веществ, происходящих внутри клетки

Практическое использование ферментов

- **В пищевой промышленности** (интенсификация технологического процесса, повышение выхода и качества готовой продукции)
- **В с/х** (получение высококачественных кормов, белково-витаминных концентратов)
- **В промышленности** (борьба с метаном в шахтах, био добавки в стиральные порошки)
- **В медицине** (получение витаминов, гормонов, алкалоидов)

По назначению

Элективные (избиратель-ные)

Накопления

ДДС (углеводолитические протеолитические гемолитические)

Консервирую-щие

- **элективные (избирательные)** среды служат для выделения определенного вида микробов, росту которых они благоприятствуют, задерживая или подавляя рост сопутствующих МОК (соли желчных кислот, подавляя рост E. coli, делают среду элективной для возбудителя брюшного тифа. Среды становятся элективными при добавлении к ним определенных АБ, солей, изменения pH
- **среды накопления** - жидкие элективные среды (пептонная вода с pH 8,0 – активно размножается холерный вибрион, др. МКО не растут)
- **дифференциально-диагностические среды** - позволяют отличить (отдифференцировать один вид МКО от другого по ферментативной активности:
  А) **углеводолитические:** среды Гисса, Эндо, Левина, Плоскирева (состав, цвет колоний)
  Б) для определения **протеолитической активност**и: расщепляют белки с выделением H_2S, индола, аммиака на средах - МПБ, с молоком, желатином, сывороткой
  В) для определения **гемолитической активности** - среды с кровью (КА)
- **консервирующие среды** – для первичного посева и транспортировки исследуемого материала (предотвращают отмирание патогенных МКО, подавляют развитие сапрофитов: глицериновая смесь для сбора испражнений и последующего исследования с целью обнаружения ряда кишечных бактерий)