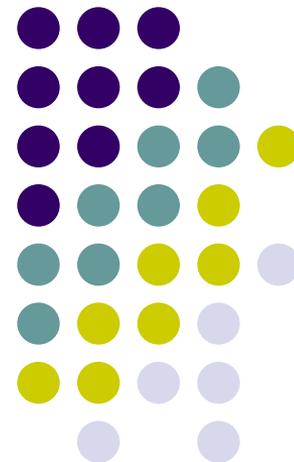


Министерство образования и науки Российской Федерации  
Федеральное бюджетное государственное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Оренбургский государственный университет»  
Химико-биологический факультет  
Кафедра биохимии и микробиологии

# Микроорганизмы и важнейшие химические факторы среды обитания

## Лекция 4

Лектор: Давыдова Ольга Константиновна, к.б.н., доцент

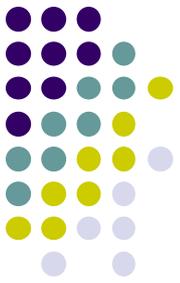


# План лекции:



- Механизмы осмотолерантности.
  - Понятие водной активности.
  - Молекулярные механизмы осмотолерантности.
- Микроорганизмы и молекулярный кислород
  - Становление биосферы, возникновение кислорода.
  - Свойства молекулярного кислорода.
  - Методы измерения концентрации молекулярного кислорода.
  - Разнообразные функции кислорода в метаболизме прокариот.
  - Кислород – важнейший экологический фактор.
  - Классификация микроорганизмов по отношению к молекулярному кислороду.
  - Активные формы кислорода, этапы их восстановления в микробной клетке и механизмы защиты клетки.

# Активность воды



Важной характеристикой местообитаний МО является доступность воды, степень доступности которой для химических реакций и МО выражают величиной ее **активности  $a_w$** .

МО могут расти на средах со значениями  $a_w = 0,99-0,60$ .

Большинство МО не может расти при  $a_w$  ниже 0,95, и не обнаружены МО, растущие при  $a_w$  ниже 0,60.

Лучше всех МО при низкой  $a_w$  растут мицелиальные грибы и дрожжи.

# Активность воды



**Активности воды ( $a_w$ )** - степень доступности воды для химических реакций и микроорганизмов

$$a_w = P/P_0 = \text{РОВ}/100 = \frac{\Pi_2}{\Pi_1 - \Pi_2}$$

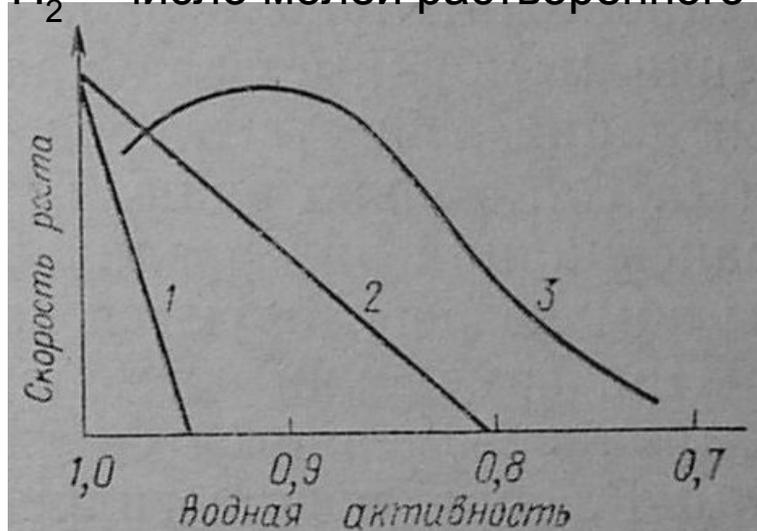
$P$  - давления пара жидкости,

$P_0$  - давление пара дистиллированной воды,

$\text{РОВ}$  – равновесная относительная влажность – относительная влажность в состоянии равновесия (при которой продукт не впитывает влагу и не выделяет её в окружающую среду),

$\Pi_1$  - число молей растворителя,

$\Pi_2$  – число молей растворённого вещества.



- 1 – обычные микроорганизмы;
- 2 – осмотолерантные (галотолерантные) микроорганизмы;
- 3 – осмофильные (галофильные) микроорганизмы.

# Активность воды



Водная активность ( $a_w$ )  
для растворов некоторых веществ при 25<sup>0</sup> С

водная активность ( $a_w$ )	концентрация NaCl, г/100 мл воды	концентрация сахарозы, г/100 мл воды	концентрация глицерина, г/100 мл воды
0.995	0.86	0.92	0.26
0.980	3.5	3.42	1.0
0.960	7.0	6.5	2.0
0.900	16.2	14.0	5.1
0.850	23.0	20.5 (насыщ.)	7.8
0.800	30.0 (насыщ.)	---	10.5
0.700	---	---	16.8
0.650	---	---	20.0

# АКТИВНОСТЬ ВОДЫ



Значения водной активности  $a_w$ ,  
лимитирующие рост некоторых микроорганизмов

$a_w$	Бактерии	Дрожжи	Мицелиальные грибы	Водоросли
1.00	Caulobacter Spirillum	Basidiomycetes		Большинство групп
0.95	Многие грамположительные палочки			
0.90	Многие кокки Lactobacillus Bacillus	Ascomycetes		
0.85	Staphylococcus	Debariomyces Saccharomyces bailii		
0.80			Penicillum	
0.75	Halobacterium Halococcus		Wallemia Aspergillus Chrysosporum	Dunaliella
0.65		Saccharomyces rouxii	Xeromyces bisporus	

# Активность воды:



- Зависит от температуры (наибольшая устойчивость МО к низким значениям  $a_w$  наблюдается в условиях температурного оптимума, при отклонении от которого нижний уровень  $a_w$  повышается).
- Активность чистой воды равна единице.
- При взаимодействии воды с поверхностями, анионами и катионами, любыми гидрофильными группами  $a_w$  становится меньше единицы.
- Может изменяться двумя путями:

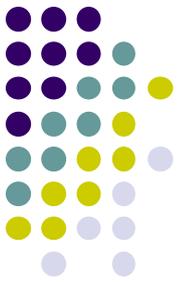
↙

**Осмотическое изменение** – происходит в результате взаимодействия молекул воды с растворенными веществами

↘

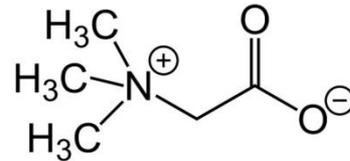
**Матричное изменение** – обусловлено адсорбцией молекул воды на поверхностях твердых субстратов

# Осморегуляция микроорганизмов



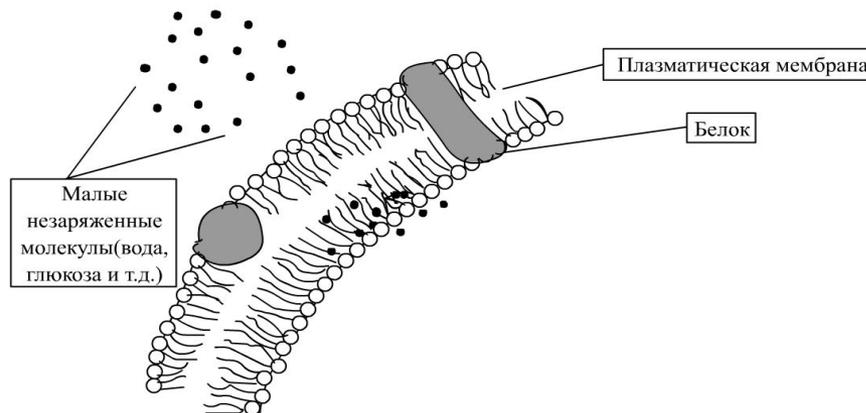
Влияние концентрации раствора на рост опосредовано влиянием осмотического давления.

Для поступления воды в клетку цитоплазма должна содержать низкомолекулярные вещества - **осмопротекторы (осмолиты)** – (это некоторые аминокислоты и их производные, сахара, гетерогликозиды) - и ионы в более высокой концентрации, чем окружающая среда.



**Бетайн** (от лат. *beta* — свёкла) — триметильное производное глицина — триметилглицин

Второй распространенной системой осморегуляции в живой природе является система избирательного накопления в клетках ионов  $K^+$ .



# Осморегуляция микроорганизмов



<b>Организмы</b>	<b>Осмолитики</b>
<i>Dunaliella sp.</i>	глицерин
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	сахароза
<i>Saccharomyces rouxii</i>	арабит
<i>Synechococcus sp.</i>	гликозилглицерин
<i>Synechocystis DU 52</i>	бетаин
<i>Escherichia coli</i>	пролин, глутаминовая кислота, γ-аминомасляная кислота
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	пролин, глутаминовая кислота
<i>Serratia marcescens</i>	пролин
<i>Staphylococcus aureus</i>	пролин, глутаминовая кислота
<i>Streptococcus faecalis</i>	пролин, γ-аминомасляная кислота
<i>Ectothiorhodospira sp.</i>	бетаин
<i>Halobacterium sp.</i>	K <sup>+</sup>

# Матричное изменение активности воды



На поверхности субстрата удерживается плёночная вода (ОВ>94%).

Основными механизмами защиты от высыхания служит **образование слизистых капсул или переживающих клеток** (спор, конидий, цист). Высокую устойчивость на воздухе обнаруживают многие микобактерии с **высоким содержанием липидов в клеточной стенке.**

# Осмотические свойства растворов



На рост МО влияет концентрация растворов, опосредованная влиянием **осмотического давления**, которое, в свою очередь, изменяет водную активность.

Способность МО развиваться в средах с широко варьирующей осмолярностью называют **осмотолерантностью**.

**Осмофильными** обычно называют МО, развивающиеся в средах с высокой концентрацией *сахара* (мицелиальные грибы, дрожжи, спироплазмы).

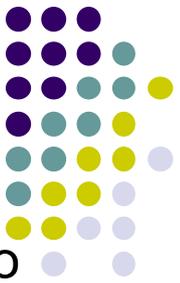
# Негалофильные и галотолерантные



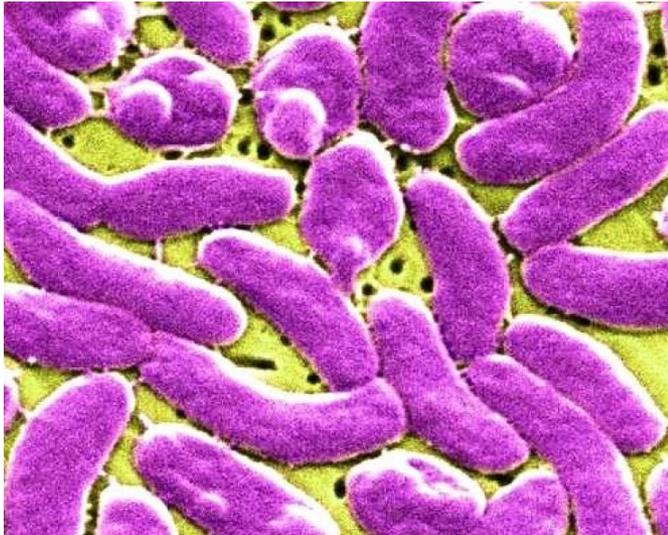
**Пресноводные (негалофильные) МО** – развиваются в среде с содержанием солей  $<0,01\%$  и обычно чувствительны к  $3\%$  концентрации NaCl. Это обитатели ультрапресных вод, многочисленные бактерии, обитающие в пресных почвах, связанные с организмом человека, животных, с растениями.

**Галотолерантные МО** – выдерживают более высокие концентрации и часто обитают в местах с меняющейся соленостью, например в почве.

# Морские

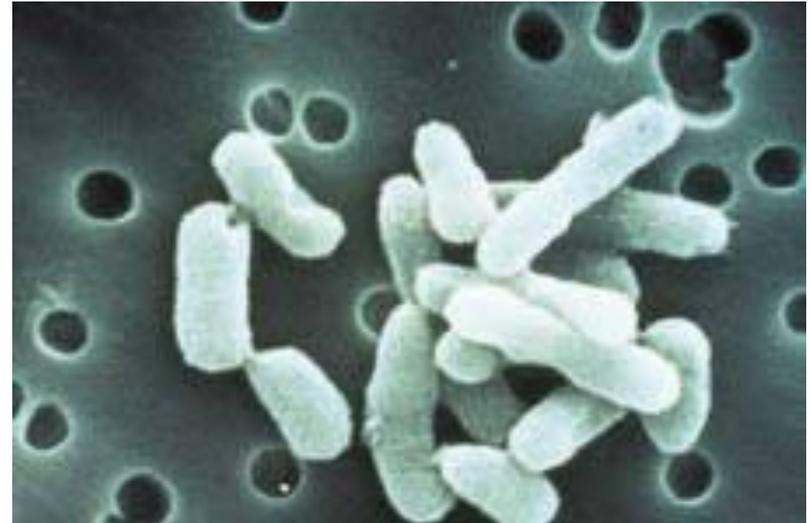


**Морские** бактерии – оптимум солености составляет около 3,5 %. Как правило, они растут в узком диапазоне концентраций соли: 2,5 — 5,0% NaCl. Типичными морскими бактериями являются *Alteromonas*, *Vibrio*, *Photobacterium*.



*Vibrio vulnificus*

© [http://parasites.czu.cz/food/\\_data/267.jpg](http://parasites.czu.cz/food/_data/267.jpg)



*Photobacterium phosphoreum*

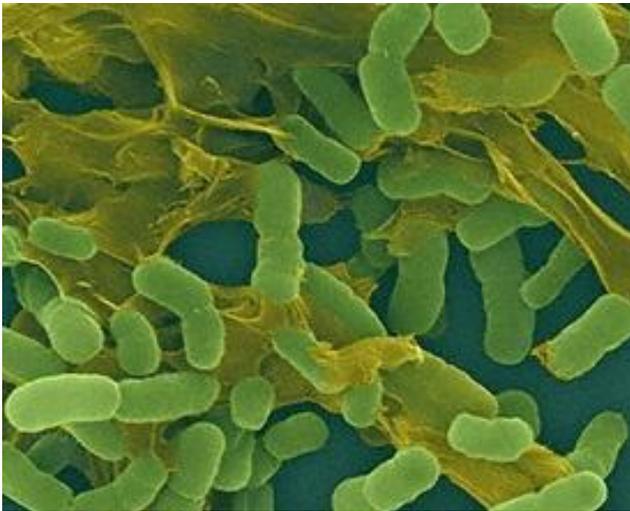
© <http://www.nanonewsnet.ru/news/2010/kachestvo-vody-pomogut-otsenit-bakterii-biosensory>

# Умеренные галофилы



- растут в диапазоне солености примерно 5-15%. Развиваются в засоленных почвах, водоемах, соленых продуктах. Это представители родов *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Halomonas*.

Они нуждаются в ионах Na, K, Mg. Осморегуляция при увеличении концентрации соли в среде осуществляется за счет увеличения концентрации бетаина, а при снижении – увеличение в мембране отрицательно заряженных фосфолипидов.



*Acinetobacter baumannii*

© <http://www.denniskunkel.com/DK/Bacteria/28830A.html>



*Alcaligenes viscolactis*

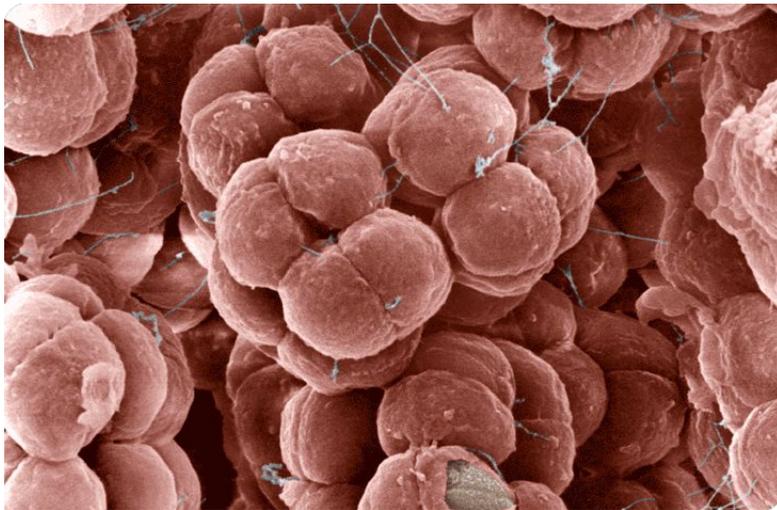
© <https://microbewiki.kenyon.edu/images/5/5a/42-23598131-1-.jpg>

# Экстремальные галофилы

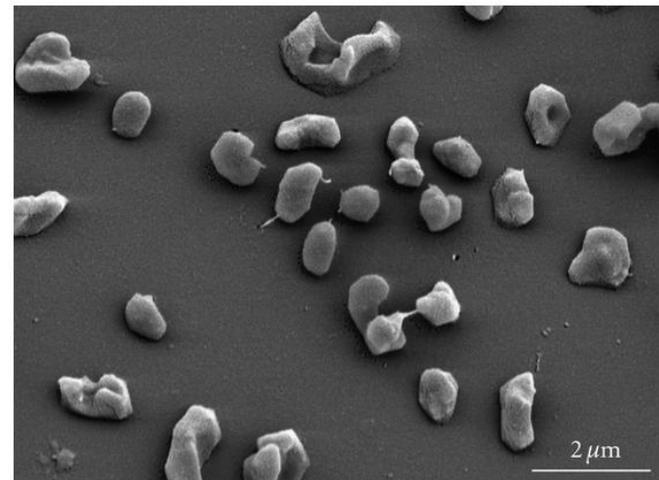


- развиваются при концентрации NaCl от 12 - 15% вплоть до насыщенных растворов соли. Обитают в гипергалинных водоемах, морских лагунах.

Представители родов *Dunaliella* (одноклеточная водоросль – осмотроф и в качестве осмолинов накапливает глицерол), *Microcoleus*, *Haloanaerobiales*, *Halobacterium*, *Halococcus*, *Haloarcula*, *Ectothiorhodospira halophila*, *Ect.halochloris*, *Methanohalophilus*, *Methanobolus*, *Desulfovibrio halophilus*. Осморегуляция осуществляется за счет изменения концентрации бетаина.



*Halococcus salifodinae*



*Methanohalophilus mahii*

©

<http://www.microbiologyonline.org.uk/about-microbiology/introducing-microbes/archaea>

©<http://metanogen.biotech.uni.wroc.pl/methanomicrobia/methanosarcinales/methanosarcinaceae/methanohalophilus/methanohalophilus-mahii/>

# Галобактерии и галоалкалифилы



**Галобактерии** отличаются наличием красного пигмента. Развиваются в аэробных условиях в засоленных водоемах, солеварнях и солончаковых почвах.

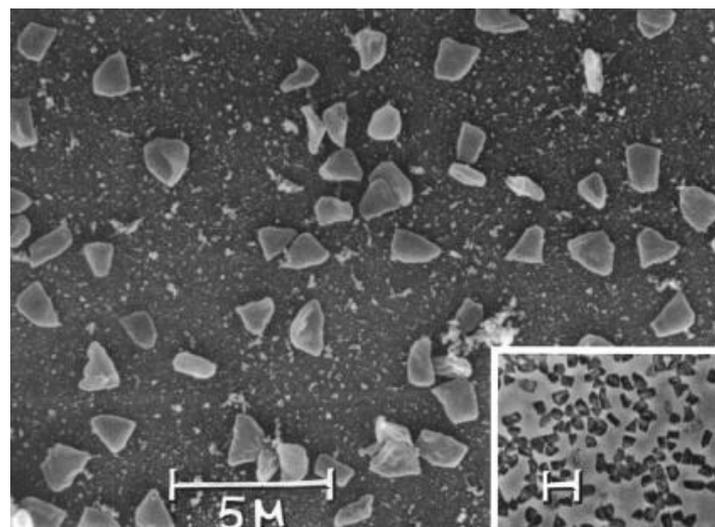
Представители: *Halobacterium*, *Hallococcus*, *Haloarcula*.

Особую группу составляют **галоалкалифилы**, растущие при высоких концентрациях соды и сочетающие в себе свойства экстремальных галофилов и алкалифилов. Типичными их местообитаниями являются высокоминерализованные содовые озера.



*Halobacterium* spp.

© <http://www.denniskunkel.com/detail/15787.html>



*Haloarcula californiae*

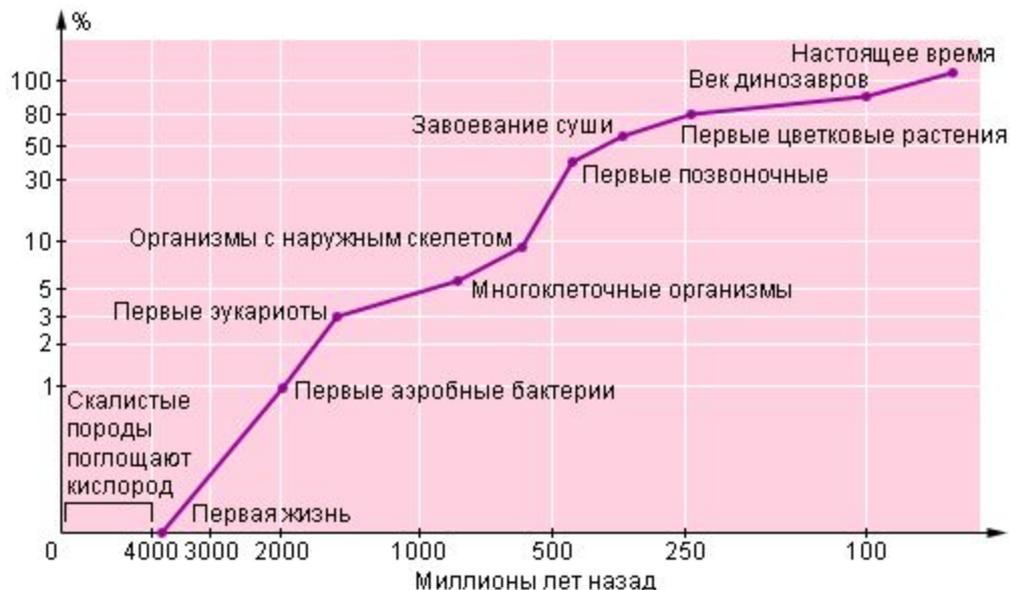
©

[http://gcat.davidson.edu/mediawiki-1.19.1/index.php/Haloarcula californiae](http://gcat.davidson.edu/mediawiki-1.19.1/index.php/Haloarcula_californiae)

# Роль прокариот в становлении биосферы



- 400 млн. лет назад – формирование мира наземных растений (содержание кислорода уже постоянно)
- 600 млн. лет назад – формирование мира многоклеточных животных
- 1,5 млрд. лет назад – появление крупных протистов
- 2,7 млрд. лет назад – у прокариот возникает процесс фотосинтеза.



# Свойства молекулярного кислорода

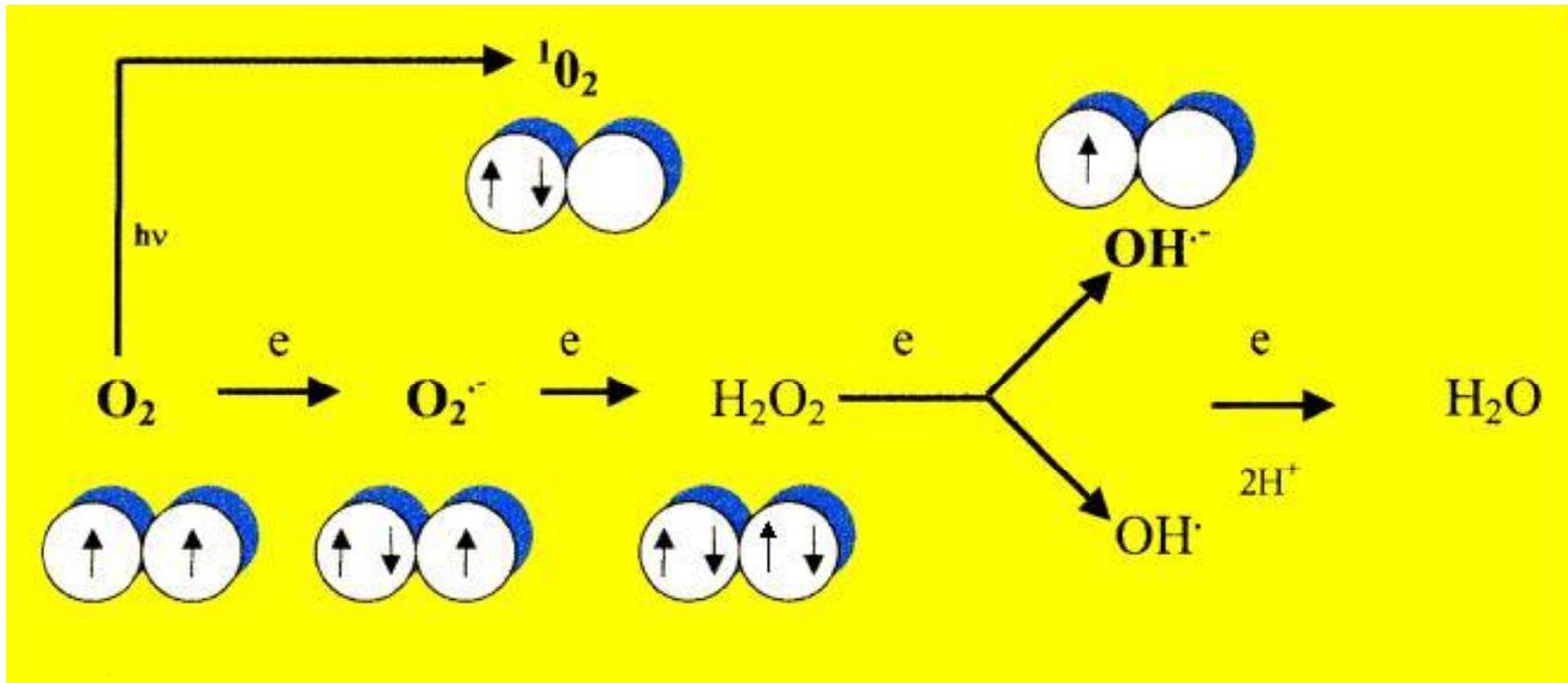


- Содержание кислорода в атмосфере 21%
- В клетки проникает путём диффузии через мембрану
- Основная форма кислорода - триплетная
- Высокорреакционноспособные формы:
  - супероксид-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ),
  - пероксид водорода ( $H_2O_2$ ),
  - гидроксил-радикал ( $HO\cdot$ )

# Свойства молекулярного кислорода



## Генерация различных активных форм из молекулярного кислорода



# Методы измерения концентрации кислорода



- Оксистат с кислородным электродом
- Капилляры Перфильева
- Микроэлектроды

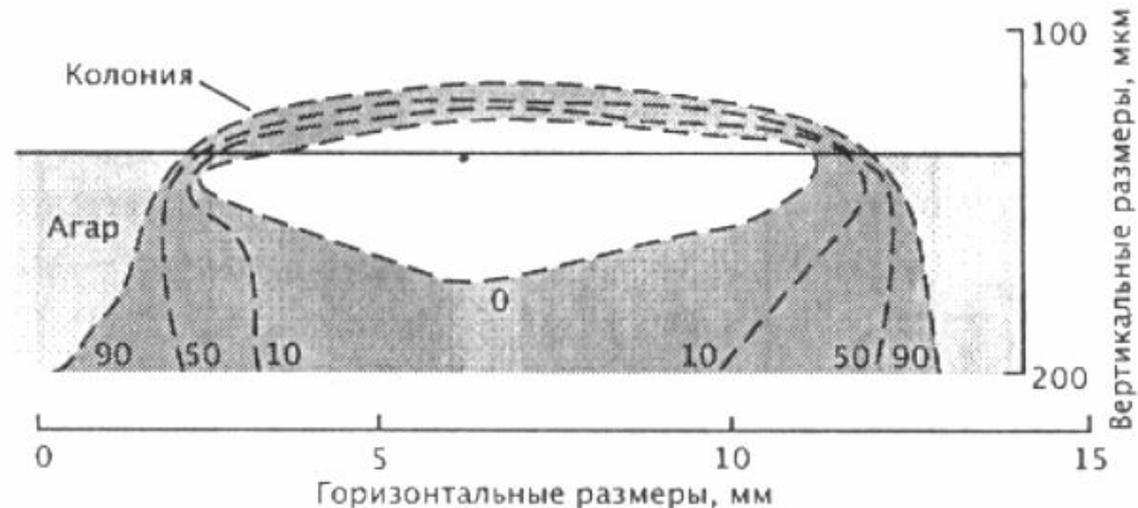


Схема градиентов концентрации кислорода  
внутри и на поверхности колонии

рис. из книги Громова Б.В., Павленко Г.В., «Экология бактерий», 1989 г.

# Функции кислорода в метаболизме



## 1) Определяет окислительно-восстановительные условия среды

Степень аэробности или анаэробности среды может быть охарактеризована количественно при помощи окислительно-восстановительного потенциала.

**Окислительно-восстановительный потенциал (ОВП)** выражают символом  $rH_2$  это индекс аналогичный pH. Но pH выражает степень кислотности и щелочности, а  $rH_2$  – **степень аэробности и анаэробности. Это отрицательный логорифм концентрации атомов водорода в среде.**

В водном растворе, полностью насыщенном кислородом,  $rH_2 = 41$ , а в условиях полного насыщения среды водородом  $rH_2 = 0$ . Таким образом, шкала от 0 до 41 характеризует любую степень аэробности.

## 2) Является субстратом для аэробных микроорганизмов

**Аэротаксис** - передвижение микроорганизмов к источнику кислорода (положительный аэротаксис) или от него (отрицательный). Положительный аэротаксис свойствен **аэробам**, отрицательный – **анаэробам**.

# Реакция различных бактерий на кислород



С самой поверхности и до глубины 10 мм  $rH_2$  составлял 20 единиц.

Ниже 10 мм  $rH_2$  был равен 14 .

На глубине 13 мм — 12,5,

при 16 мм. — 9,2,

при 18 мм всего 7,4.

Оказалось, что строгие анаэробы могут развиваться в средах с  $rH_2$  не выше 14.

В области  $rH_2$  выше 14 находится зона развития аэробов.

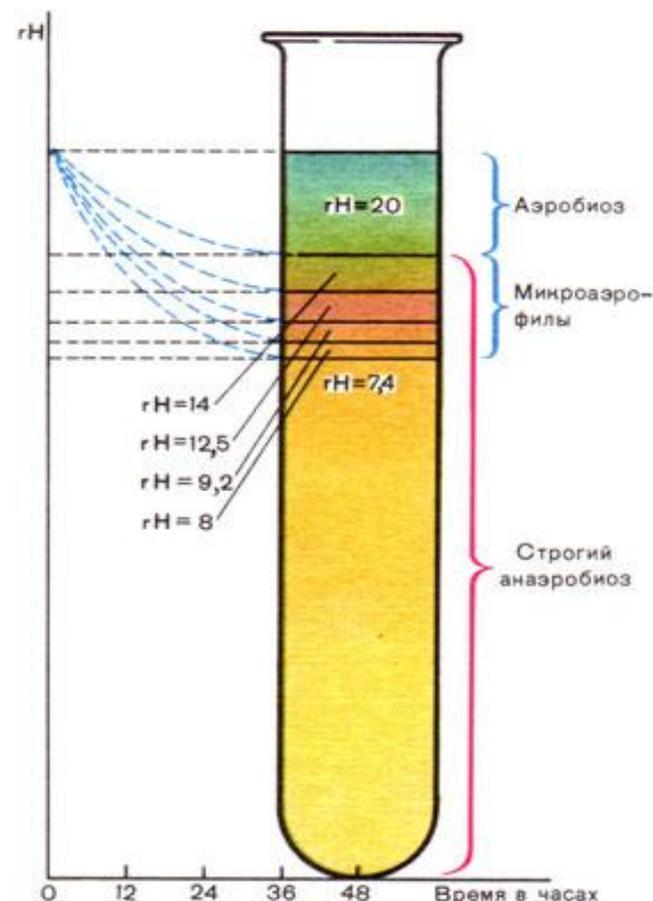
В промежуточной области могут развиваться

микроаэрофильные формы,

приспособившиеся к развитию в средах

с низкими концентрациями свободного

кислорода.

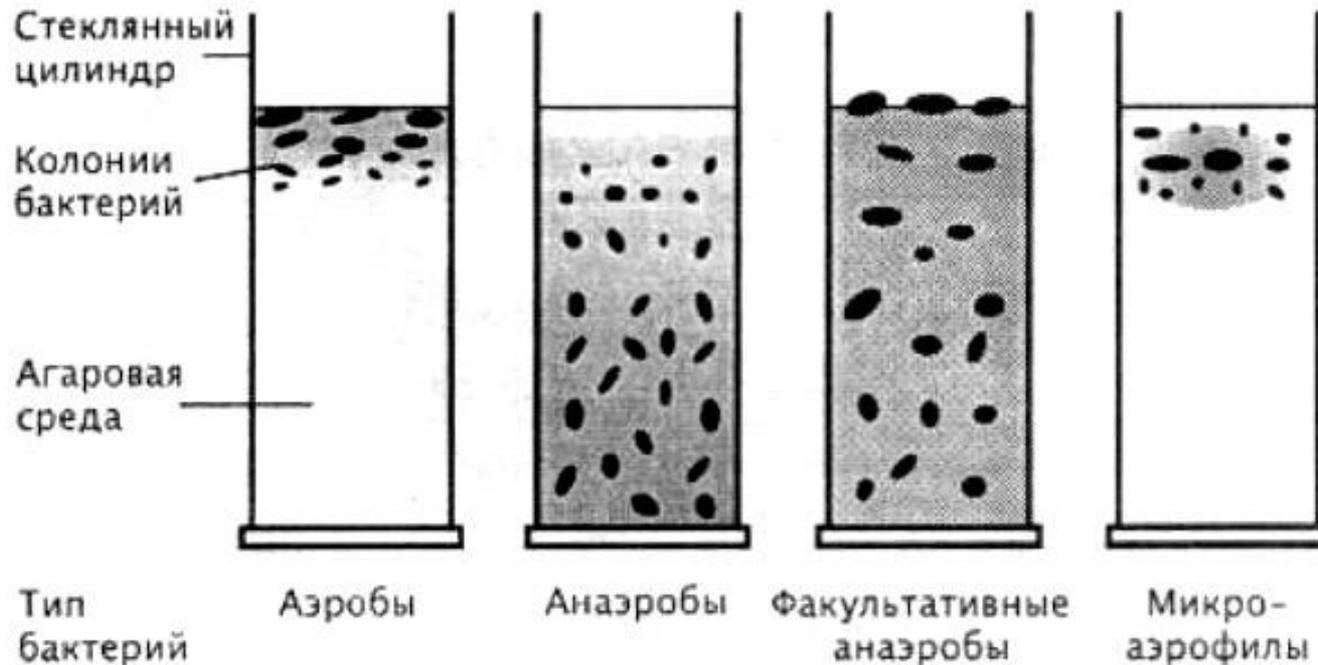


Изменение окислительно-восстановительного потенциала в питательной среде при доступе воздуха (опыт Прево)

© [http://dic.academic.ru/dic.nsf/enc\\_biology](http://dic.academic.ru/dic.nsf/enc_biology)©

[http://dic.academic.ru/dic.nsf/enc\\_biology/2572/Физиологические](http://dic.academic.ru/dic.nsf/enc_biology/2572/Физиологические)

# Реакция различных бактерий на кислород

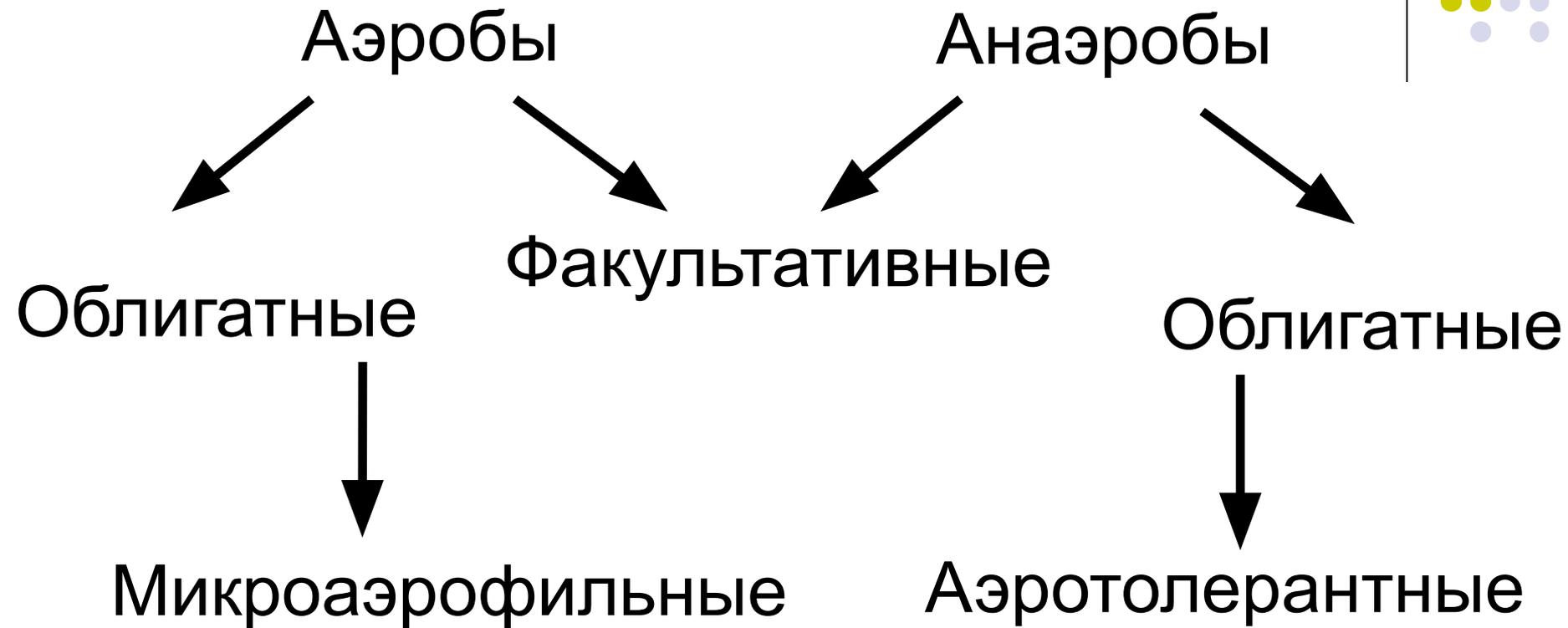


© <https://ru.wikipedia.org/wiki/>©

[https://ru.wikipedia.org/wiki/Анаэробные\\_организмы](https://ru.wikipedia.org/wiki/Анаэробные_организмы)

Если бактерии, относящиеся к различным физиологическим типам, засеять в расплавленную и остуженную агаризованную среду, содержащую необходимые субстраты, то после соответствующей инкубации можно наблюдать в застывшем агаре рост колоний в тех зонах столбика, где концентрация кислорода адекватна потребностям данного микроорганизма.

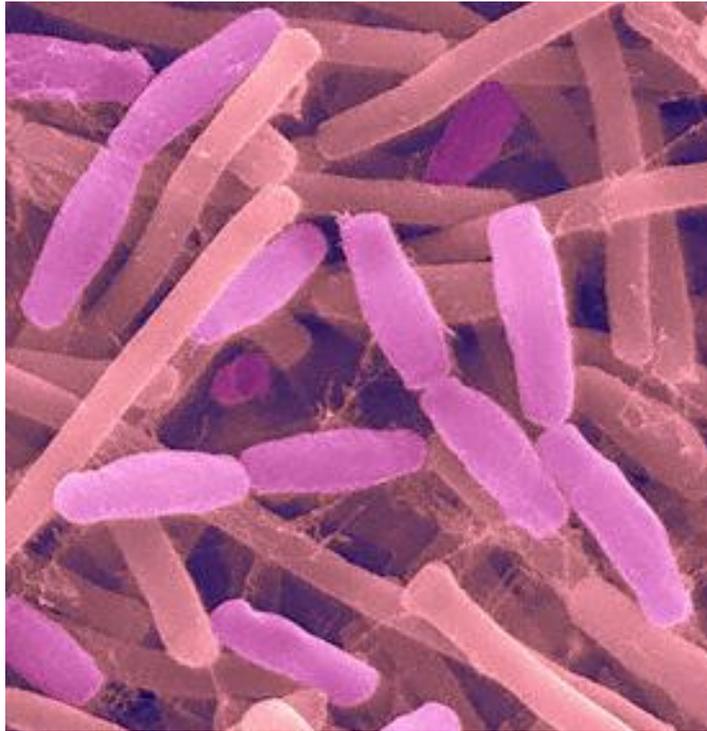
# Классификация



# Облигатные аэробы



Прокариоты, для роста которых  $O_2$  необходим, называют **облигатными** (обязательными) аэробами. Они не способны получать энергию путем брожения. Их ферменты осуществляют перенос электронов от окисляемого субстрата к кислороду. К ним относится большинство прокариотных организмов, например, *B. subtilis*, микрококки и др.



*Bacillus subtilis*

© <http://www.denniskunkel.com/DK/Bacteria/261306D.html>



*Micrococcus luteus*

© <http://www.micronaut.ch/shop/micrococcus-bacteria/>

# Микроаэрофилы

Некоторые микроорганизмы не способны к росту при концентрации  $O_2$ , равной атмосферной, но могут расти, если содержание  $O_2$  в окружающей среде будет значительно ниже (порядка 2%).



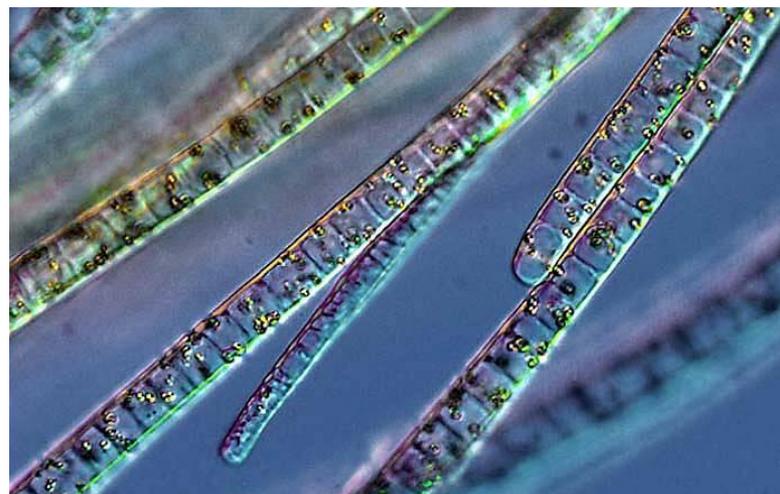
Rhizobium sp.

© <http://www.micronaut.ch/shop/rhizobium-bacteria/>



Campylobacter jejuni

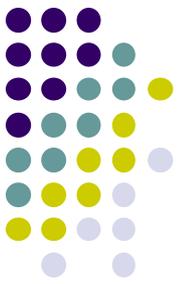
© [http://www.bacteriainphotos.com/campylobacter\\_jejuni.html](http://www.bacteriainphotos.com/campylobacter_jejuni.html)



Beggiatoa sp.

© [http://www.fytoplankton.cz/fytofoto.php?fyto\\_foto=0041](http://www.fytoplankton.cz/fytofoto.php?fyto_foto=0041)

# Факультативные анаэробы



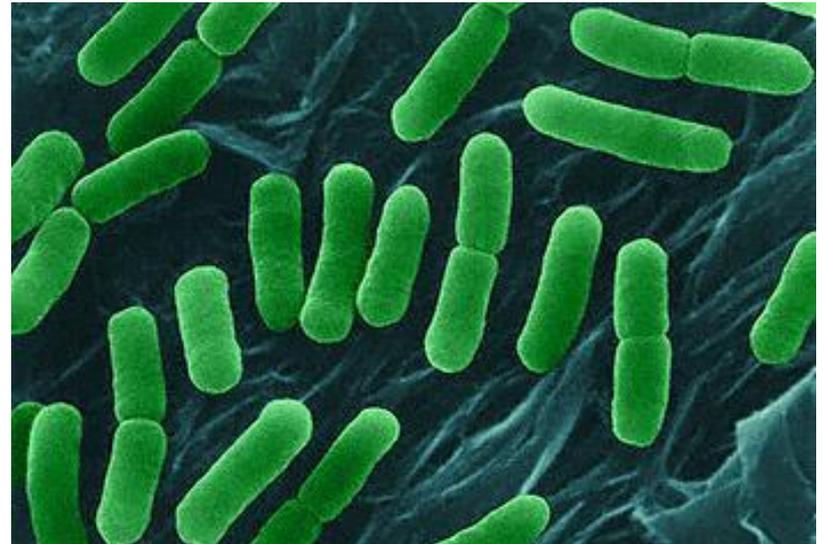
**Факультативные анаэробы** могут жить как при наличии, так и в отсутствии кислорода. Типичными представителями этой группы являются кишечная палочка, стрептококк, стафилококк. Кишечная палочка на среде с углеводами развивается как анаэроб, сбраживая сахара, а затем начинает использовать кислород, как типичный аэробный организм, окисляя до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  образовавшиеся продукты брожения (например, молочную кислоту).



Lactobacillus sp.

©

<http://www.gettyimages.com.au/detail/photo/lactobacillus-sp-bacteria-coloured-scanning-high-res-stock-photography/140524942>



Escherichia coli

© [http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2008/moder\\_just/](http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2008/moder_just/)

# Облигатные анаэробы



**Облигатные анаэробы** не используют молекулярный кислород. Более того, он для них токсичен. Многие ферменты этих бактерий денатурируют при контакте с молекулярным кислородом.

Значительное количество представителей анаэробных бактерий относится к роду *Clostridium* (*C. tetani* – возбудитель столбняка, *C. botulinum* – ботулизма, *C. perfringens* – возбудитель газовой гангрены). Они широко распространены в почве, озерных отложениях. Облигатные анаэробы принадлежат также к родам *Methanobacterium*, *Bacteroides*.



*Clostridium botulinum*



*Treponema pallidum*

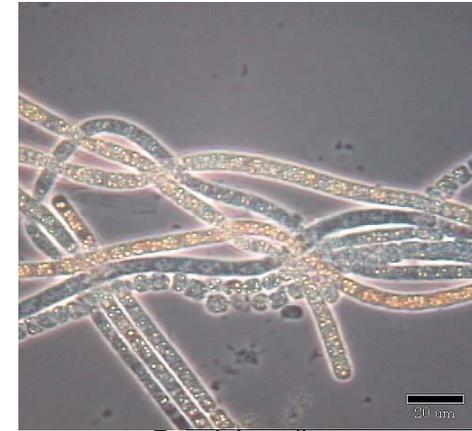
# Механизмы защиты



- Толстая клеточная стенка
- Слизистая капсула
  
- Конформационная защита
  
- Химическая детоксикация
  - Глутатион,
  - Антиоксиданты (каротиноиды)
  
- Ферментативная детоксикация
  - Каталазы, пероксидазы, супероксиддисмутазы (СОД)
  
- Система ответа на окислительный стресс (ген *oxy R*)
  - каталазы, пероксидазы, супероксиддисмутазы,
  - белки теплового шока,
  - ферменты репарации ДНК

# Механизмы защиты

*Beggiatoa* формируют клубки нитей, внутри которых содержание кислорода понижено в результате его поглощения клетками при дыхании. *Beggiatoa* развиваются в присутствии  $H_2S$ , который они окисляют.



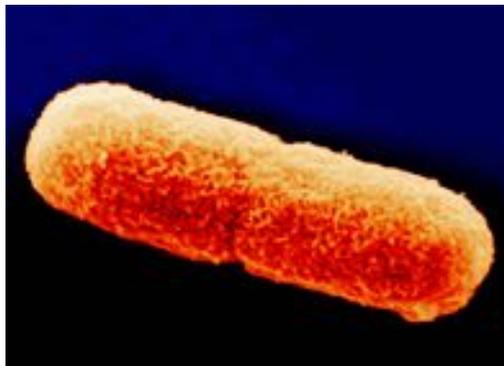
*Beggiatoa alba*

© <https://microbewiki.kenyon.edu/images/0/08/Filament.jpg>



*Rhizobium* sp.

© <http://tursweet.com/r/rhizobium-root-nodules.html>



*Azotobacter vinelandii*

© <https://www.jic.ac.uk/SCIENCE/molmicro/Azot.html>

В тканях клубеньковых накапливается леггемоглобин – белок родственный гемоглобину, который обладает высоким сродством к молекулярному кислороду и, с одной стороны способствует снабжению бактериоидов кислородом, а с другой – препятствует повышению концентрации молекулярного кислорода, что могло бы привести к угнетению активности нитрогеназы. Клетки азотобактера продуцируют толстый слой слизи, формирующий капсулу клетки, а также выработали особый механизм защиты - дыхательную защиту, осуществляемую путём интенсификации дыхания, снижающего концентрацию кислорода в клетках и присутствие специальных белков, защищающих нитрогеназу.



# Супероксидный анион - $\overset{\cdot}{\text{O}}_2^-$



**Спонтанно дисмутирует:**



**В присутствии фермента супероксиддисмутазы:**



Перекись водорода -  $\text{H}_2\text{O}_2$



# Гидроксильный радикал - **ОН·**



**Появляется**

