



Физиология бактерий

1. Химический состав
2. Ферменты бактерий
3. Питание бактерий
4. Энергетический метаболизм

Физиология бактерий

Физиология бактерий включает метаболизм бактерий, т.е. питание, получение энергии, рост и размножение, а также их взаимодействие с окружающей средой.

Метаболизм бактерий лежит в основе изучения и разработки методов их культивирования, получения чистых культур и их идентификации.

Химический состав микробной клетки

Вода – основной компонент бактериальной клетки, составляющий около 80% её массы. В спорах количество воды уменьшается до 20%. В спорах вода находится в связанном состоянии, а в вегетативных клетках – в свободном. Больше воды содержат молодые формы и меньше – зрелые.

С участием воды осуществляются биохимические и физиологические процессы в клетке. При уменьшении количества воды замедляется жизнедеятельность, а высушивание может приводить к гибели. Однако большинство бактерий хорошо переносят высушивание, но при недостатке воды они не размножаются.

Химический состав микробной клетки

В сухом веществе бактерий

- 52% составляют белки,
- 17% - углеводы,
- 9% - липиды,
- 16% - РНК,
- 3% - ДНК
- 3% - минеральные вещества

Белковые вещества

Бактерии содержат более 2000 различных белков, находящихся в структурных компонентах и участвующих в процессах метаболизма. Различают простые белки (протеины), состоящие из сочетаний 20 остатков аминокислот, и сложные – протеиды (комплексы белков с небелковыми группами – липопротеиды, нуклеопротеиды, гликопротеиды).

В состав белков входят как обычные аминокислоты, так и оригинальные- *диаминопимелиновая, D-аланин, D-глутамин*, входящие в состав пептидогликана и капсул некоторых бактерий.

Только в спорах находится *дипиколиновая кислота*, с которой связана высокая резистентность спор.

Жгутики построены из белка *флагеллина*, обладающего сократительной способностью и выраженными антигенными свойствами.

Пили (ворсинки) содержат особый белок- *пилин*.

Углеводы

Углеводы в микробной клетке представлены простыми веществами (моно- и дисахаридами). Полисахариды часто входят в состав капсул и КС у Грам(-) бактерий.

Внутриклеточные полисахариды (крахмал, гликоген и др.) являются запасными питательными веществами клетки.

Некоторые полисахариды принимают участие в формировании антигенов (О-АГ, К-АГ)

Липиды

Липиды входят в состав ЦПМ и её производных, а также КС Грам(-) бактерий. Они могут присутствовать в цитоплазме, как запасные питательные вещества. Липиды бактерий представлены фосфолипидами, жирными кислотами и глицеридами. У кислотоустойчивых бактерий в КС находятся воски, эфиры миколовой кислоты. У микоплазм – стеролы в ЦПМ.

Химический состав микробной клетки

- 1. *Биогенные* химические элементы (C, O, N, H). На их долю приходится 95% сухого остатка, в т.ч. 50%- C, 20%- O, 15%- N, 10%- H).
- 2. *Макроэлементы*- P, S, Cl, K, Mg, Ca, Na. На них приходится около 5 %.
- 3. *Микроэлементы*- Fe, Cu, I, Co, Mo и др. На них приходятся доли процента, однако они имеют важное значение в обменных процессах.

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА У БАКТЕРИЙ

- высокая скорость метаболических процессов;
- процессы диссимилиации преобладают над процессами ассимиляции;
- могут использовать любые источники основных химических соединений;
- высокая адаптационная способность к меняющимся условиям окружающей среды;
- широкий спектр различных ферментов;

Ферменты бактерий

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

Ферменты, образуемые бактериальной клеткой, могут как локализоваться внутри клетки – ***эндоферменты***, так и выделяться в окружающую среду – ***экзоферменты***.

Экзоферменты играют большую роль в обеспечении бактериальной клетки доступными для проникновения внутрь источниками углерода и энергии.

Большинство гидролаз являются экзоферментами. Ряд экзоферментов являются ***ферментами агрессии*** (гиалуронидаза, нейраминидаза, коллагеназа и др.)

- 
- Различают **конститутивные** ферменты, синтез которых происходит в течение всего клеточного цикла и **индуцибельные**, синтез которых инициируется соответствующим субстратом

Микробиологическая (рабочая) классификация бактериальных ферментов

Ферментативный спектр является таксономическим признаком, характерным для семейства, рода и в некоторых случаях для видов. Поэтому определением спектра ферментативной активности пользуются при идентификации бактерий:

1. Сахаролитические
2. Протеолитические
3. Окислительно- восстановительные.
4. Ферменты агрессии (факторы вирулентности).



ПИТАНИЕ БАКТЕРИЙ

Транспорт питательных веществ в бактериальную клетку (механизмы питания)

- Простая диффузия
- Облегченная диффузия
- Активный транспорт
- Транслокация радикалов

Механизмы транспорта веществ в клетку

Наружная

Мембрана

Внутренняя

среда

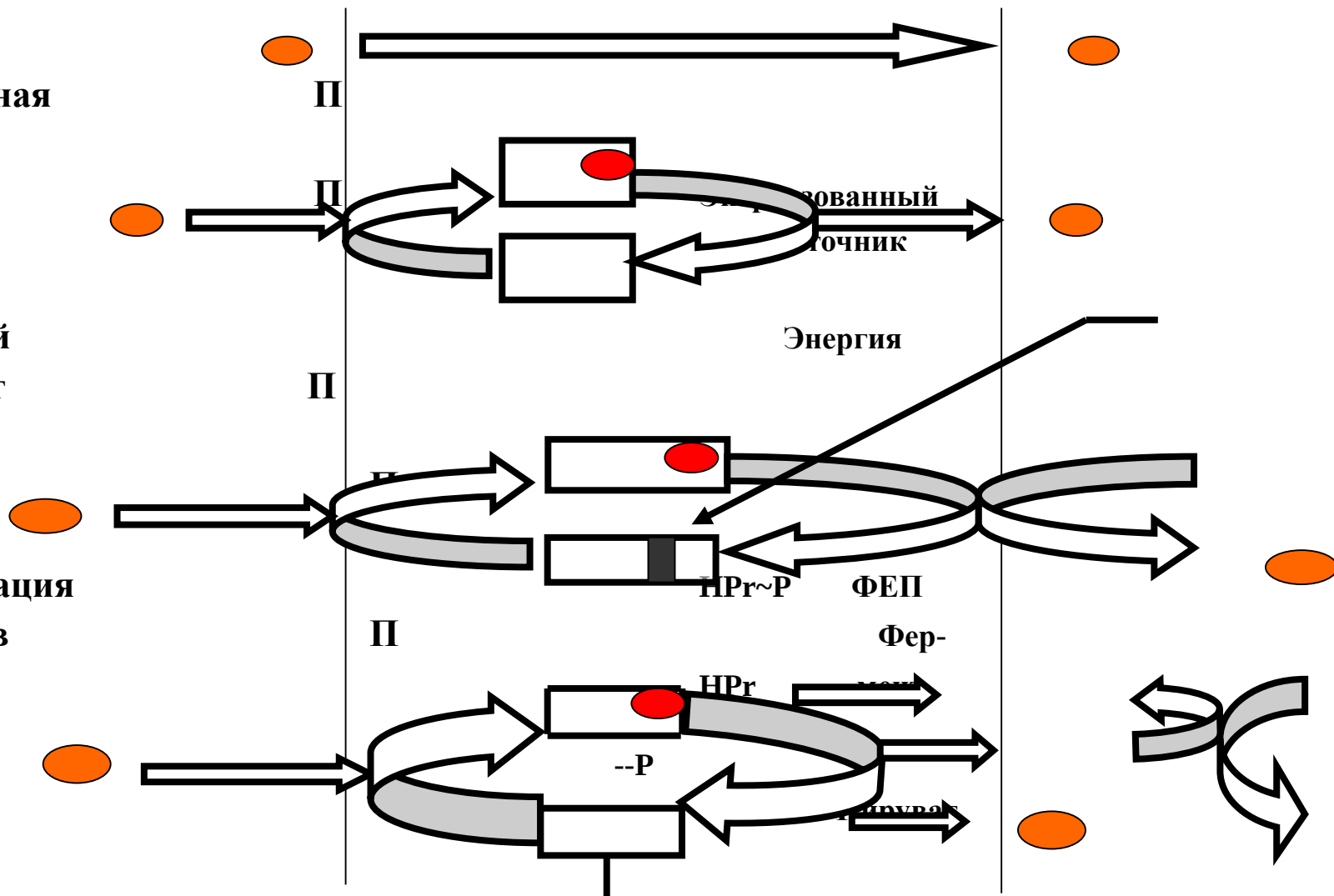
среда

Простая
диффузия

Облегчённая
диффузия

Активный
транспорт

Транслокация
радикалов



Типы питания бактерий

Основной целью метаболизма бактерий является ***рост***, т.е. координированное увеличение всех компонентов клетки. Поскольку остов всех органических соединений построен из атомов углерода, то для роста требуется постоянный приток углерода.

По источнику углерода

- **Аутотрофы** – используют для построения клеток неорганический углерод в виде CO_2
- **Гетеротрофы** – используют органический углерод (гексозы, многоатомные спирты, аминокислоты, липиды)

Для восполнения биомассы бактериям также требуется энергия. Энергия запасается в форме молекул АТФ

По источнику энергии

- **Фототрофы** – источником энергии является свет (фотосинтез)
- **Хемотрофы** – получают энергию за счет ОВР:
 - *Литотрофы* – используют неорганические доноры электронов (H_2 , NH_3 , H_2S , Fe и др.)
 - *Органотрофы* – используют в качестве доноров электронов органические соединения

Бактерии, имеющие медицинское значение, являются ***гетерохемоорганоотрофами***.

Отличительной особенностью данной группы является то, что источник углерода у них является источником энергии.

Степень гетеротрофности у различных бактерий неодинакова. Среди них выделяют

- *Сапрофиты*, которые питаются мертвым органическим материалом и независимы от других организмов
- *Паразиты* получают питательные вещества из живых клеток

Энергетический метаболизм

В зависимости от способа получения энергии у бактерий имеется несколько типов метаболизма:

- Окислительный (дыхание)
- Бродильный (ферментативный)
- Смешанный

Тип метаболизма определяет не только реакции, в результате которых образуется АТФ, но и конечные продукты этих реакций, которые используются при идентификации бактерий, а также условия их культивирования.

Дыхание бактерий

Дыхание – процесс получения энергии в ОВР, сопряженных с реакциями окислительного фосфорилирования, при котором донорами электронов могут быть органические (у органотрофов) и неорганические (у литотрофов), а акцептором – только неорганические соединения.

У бактерий, обладающих **окислительным метаболизмом**, конечным акцептором электронов является **молекулярный кислород (O_2)**.

- Необходимая для жизнедеятельности клеток АТФ может образовываться в цитоплазме в результате гликолиза. Это процесс расщепления глюкозы (или др. гексоз) под действием различных ферментов, который не требует участия кислорода. При гликолизе 1 молекула глюкозы даёт возможность синтезировать 2 молекулы АТФ.
- Продукты расщепления глюкозы (ПВК) вступают в ЦТК (цикл Кребса). На всех стадиях этого цикла происходит поглощение кислорода и выделение углекислого газа, воды и энергии, запасаемой в молекулах АТФ.

- Главный по эффективности процесс синтеза АТФ происходит при участии кислорода в многоступенчатой дыхательной цепи. ДЦ в совокупности с ЦТК и гликолизом позволяет довести «выход» молекул АТФ с каждой молекулы глюкозы до 38:





Типичная ДЦ выглядит следующим образом:

**ЦТК – НАД(Н₂) – флавопротеид – хинон –
- цитохромы: b c a - О₂**

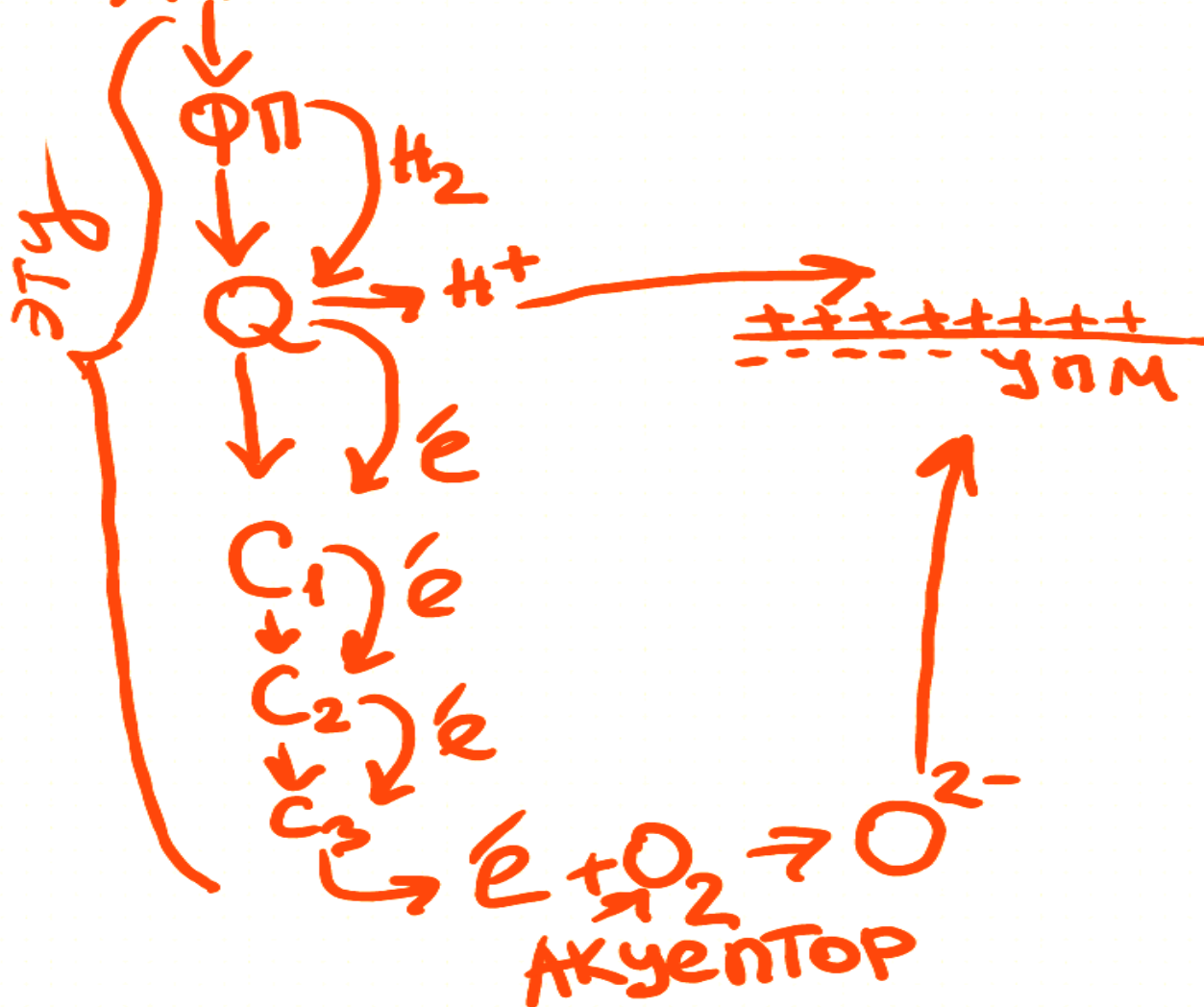
У некоторых бактерий цитохромы отсутствуют и при контакте с кислородом происходит непосредственный перенос водорода на кислород с помощью флавопротеидов, конечным продуктом при этом оказывается Н₂О₂.

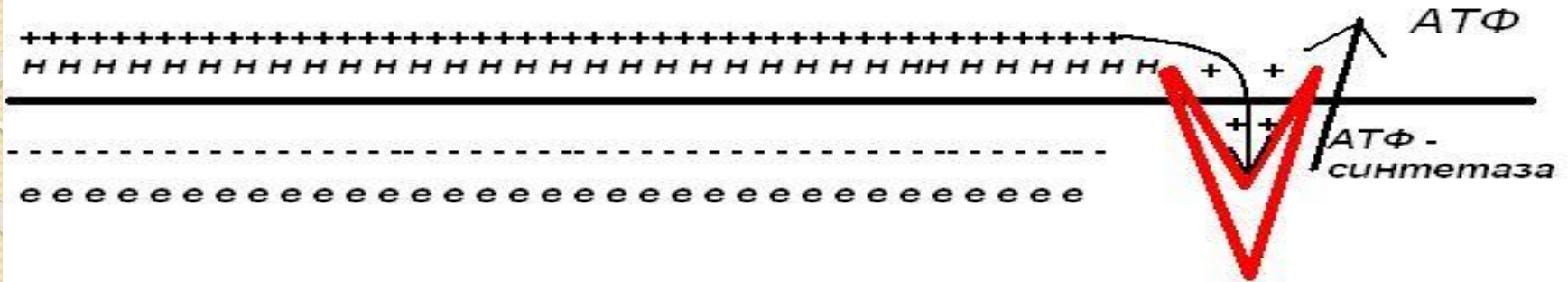
Ферменты ДЦ

- *Флавопротеиды* - окислительно-восстановительные ферменты, которые передают атомы водорода от восстановленных пиридиновых нуклеотидов (НАДН, НАДФН) последующим переносчикам.
- *Хиноны* – окислительно-восстановительные ко-ферменты, способные переносить как водород так и электроны, которые они дальше передают цитохромам. У грамотрицательных чаще встречается убихинон, у грамположительных - нафтохинон.
- *Цитохромы* - окислительно-восстановительные ферменты, которые переносят только электроны. Дыхательная цепь содержит несколько цитохромов, различающихся по окислительно-восстановительным потенциалом и другими свойствами.

УТК ДОНОР

HADH





- При переносе электронов на ЦПМ возникает трансмембранный электрохимический градиент ионов водорода.
- Протоны и электроны накапливаются по разные стороны мембраны, что создает разность потенциалов.
- Образуется протонный канал при участии фермента АТФ-синтетазы, через который протоны переходят с наружной стороны мембраны клетки на внутреннюю сторону
- Этот процесс сопровождается выделением большого количества энергии, значительная часть которой идет на синтез АТФ из АДФ



Помимо углеводов, прокариоты способны использовать другие органические соединения, в частности белки, в качестве источника энергии, окисляя их полностью до CO_2 и H_2O

Процесс аммонификации известен как гниение, при этом происходит накопление первичных аминов. Гнилостные бактерии осуществляют минерализацию белка, разлагая его до CO_2 , NH_3 , H_2S .

Анаэробное дыхание

Анаэробное дыхание – это процесс, в котором, в отличие от аэробного дыхания, конечным акцептором электронов является **связанный кислород** ($-NO_3$, $=SO_4$, $=SO_3$) в виде неорганических соединений.

При анаэробном дыхании функционируют электрон-транспортная цепь, с теми же типами переносчиков электронов и протонов, но цитохромоксидаза заменяется на соответствующие редуктазы (нитратредуктаза, сульфатредуктаза, карбонатредуктаза, фумаратредуктаза).

Типы анаэробного дыхания у бактерий

Энергетический процесс	Конечный акцептор электронов	Продукты восстановления
Нитратное дыхание и денитрификация	NO_3^- , NO_2^-	NO_2^- , NO , N_2O , N_2
Сульфатное и серное дыхание	SO_4^{2-} , S^0	H_2S
Карбонатное дыхание	CO_2	ацетат

Бродильный (ферментативный) метаболизм

Ферментация (брожение) – процесс получения энергии, при котором отщепленный от субстрата кислород переносится на органические соединения.

Кислород в процессе брожения участия не принимает. Ферментироваться могут углеводы, аминокислоты (кроме ароматических), пурины, пиримидины, многоатомные спирты. Продуктами брожения являются кислоты, газы, спирты.

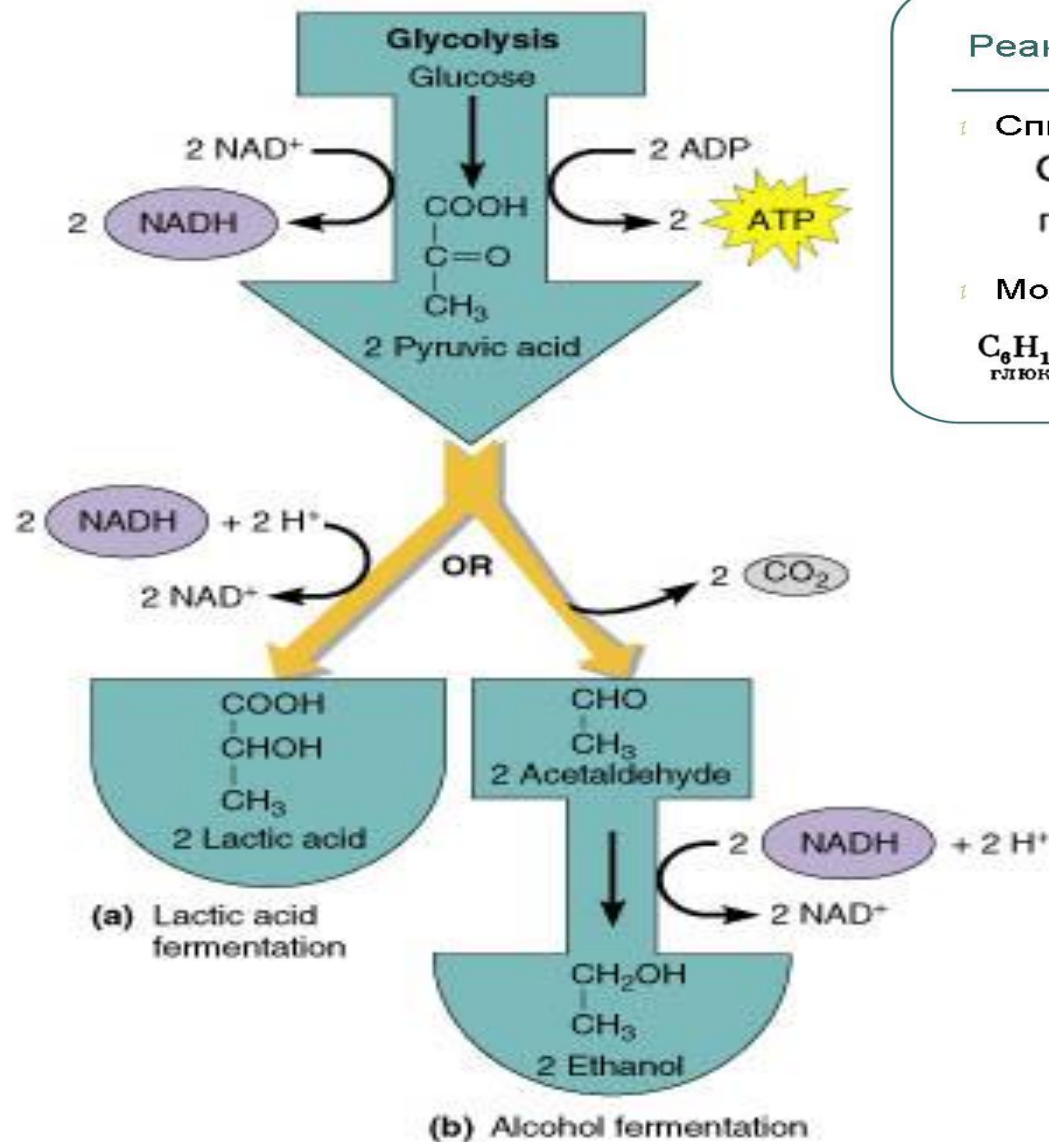
Брожение описал Луи Пастер в 1861 г. Он назвал его «жизнью без воздуха»

Типы брожения

- Спиртовое (дрожжи) – конечными продуктами являются этанол и CO_2
- Молочнокислое (стрептококки, лакто- и бифидобактерии) – продуктами являются, молочная кислота, этанол и уксусная кислота
- Маслянокислое брожение (строгие анаэробы) – масляная, уксусная, валериановая и др. органические кислоты (определение используется для идентификации анаэробов)
- Муравьинокислое (энтеробактерии, вибрионы) – муравьиная, янтарная, молочная кислоты

- Брожение протекает в 2 фазы:
 - Окислительную (гликолиз), при которой из 1 молекулы глюкозы образуется ПВК и 2 молекулы АТФ
 - Восстановительную, при которой конечным акцептором водорода выступает вещество с ненасыщенными связями (пируват или образовавшееся из него вещество).

FERMENTATION



Реакции брожения глюкозы

1 Спиртовое брожение



Глюкоза

Этанол

2 Молочнокислое брожение



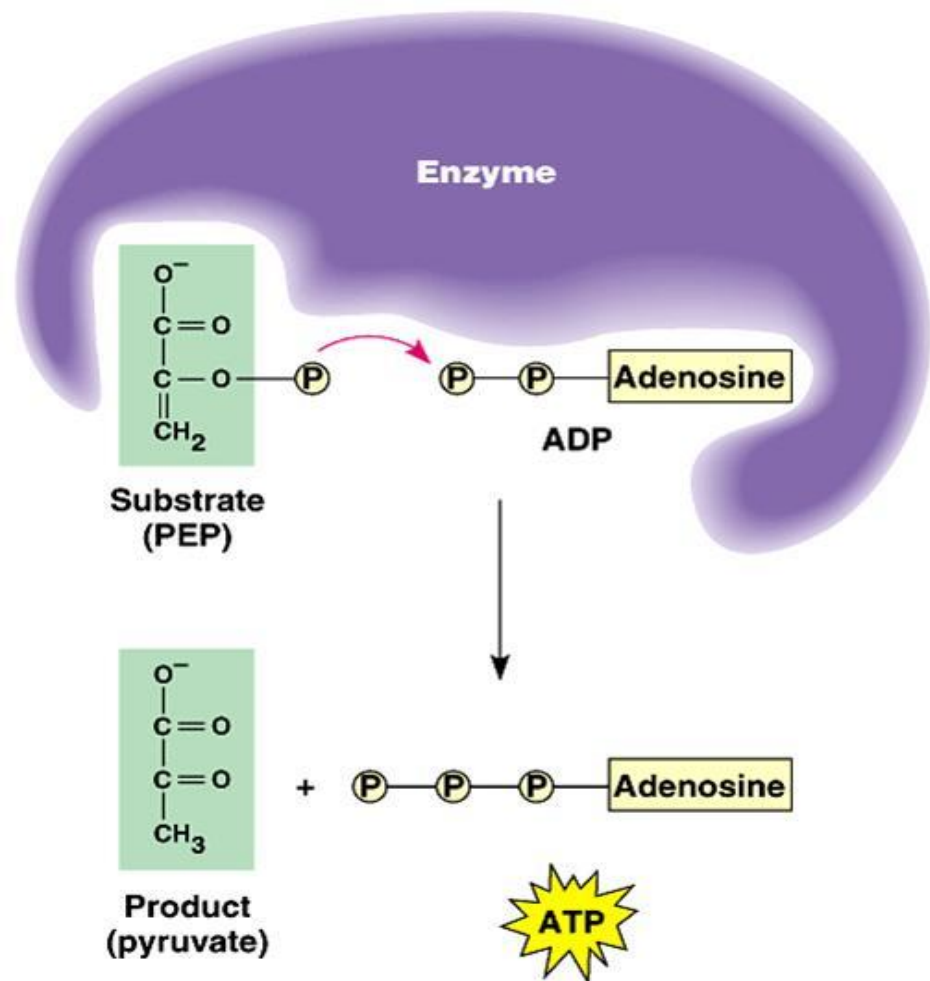
глюкоза

молочная кислота

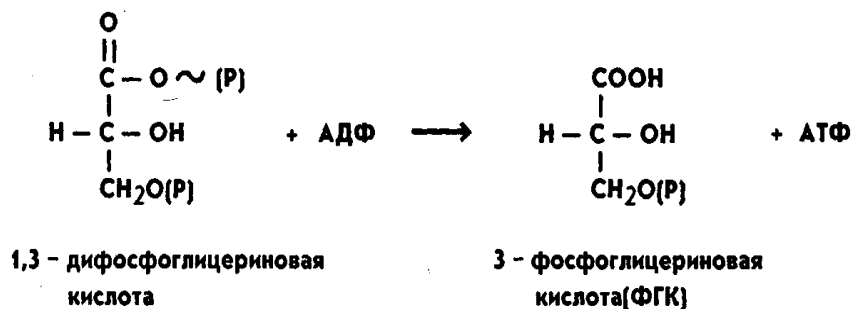
энергия

- 
- Примитивность процессов брожения заключается в том, что из субстрата извлекается лишь незначительная доля энергии, которая в нем содержится. Например, в процессе гомоферментативного молочнокислого брожения синтезируются 2 молекулы АТФ на 1 молекулу глюкозы.
 - В процессах брожения в определенных окислительно-восстановительных реакциях образуются нестабильные молекулы, фосфатная группа которых содержит много свободной энергии.
 - Эта группа с помощью соответствующего фермента переносится на молекулу АДФ, что приводит к образованию АТФ.

Субстратное фосфорилирование



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



- **Ферментация белков.** Если для бактерий с бродильным метаболизмом источником энергии служат белки, то такие бактерии называются *пептолитическими* или *протеолитическими* (клостридии). Они гидролизуют белки и сбрасывают аминокислоты. В результате образуются жирные кислоты.

Конструктивный метаболизм

Основные компоненты бактериальной клетки синтезируются в реакциях полимеризации из аминокислот, фосфатов, сахаров, пуриновых и пиримидиновых оснований, органических кислот. Среди бактерий выделяется группа (***прототрофы***), которые способны синтезировать все компоненты клетки из одного источника углерода и энергии (*неприхотливые*).

Если бактерии утрачивают способность образовывать жизненно-важное вещество (аминокислоту, витамин, пурины, пиримидины и др.), то требуется его поступление в готовом виде. Такие вещества называются ***факторами роста***, а бактерии – ***ауксотрофами*** (*прихотливые, требовательные*).



ОТНОШЕНИЕ К ФАКТОРАМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Отношение к температуре

- 1. Психрофилы- растут при температурах ниже +20 градусов Цельсия.
- 2. Мезофилы- растут в диапазоне температур от 20 до 45 градусов (часто оптимум- при 37 градусах C).
- 3. Термофилы- растут при температурах выше плюс 45 градусов.

Отношение к кислотности

Большинство бактерий, имеющих медицинское значение, живут при pH среды от 4,0 до 9,0 с оптимум около 7,0.

- Микробы, предпочитающие щелочную среду (**алкалофильные**) от 9,0 и выше (холерный вибрион)
- Микробы, предпочитающие кислую среду (**ацидофильные**) ниже 4,0 (молочнокислые бактерии)
- Бактерии, устойчивые к изменениям pH (**кислотоустойчивые**)

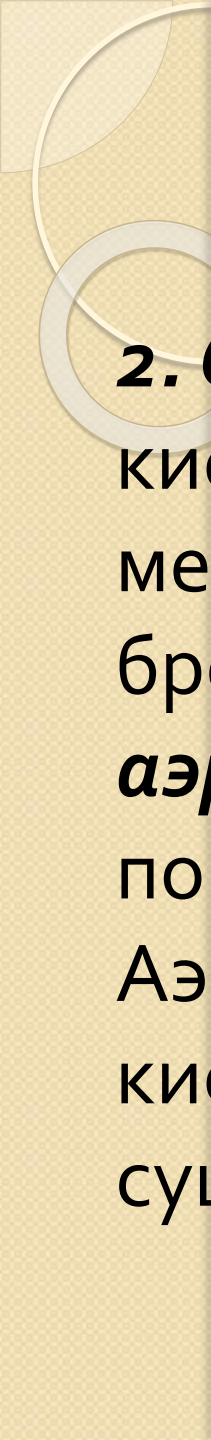
Отношение к молекулярному кислороду.

Типы дыхания

1. Облигатные аэробы. Используют молекулярный (атмосферный) кислород для получения энергии путем кислородного дыхания.

Энергию получают оксидативным метаболизмом, используя кислород как терминальный акцептор в реакции, катализируемой цитохромоксидазой.

Бывают строгие аэробы и **микроаэрофилы**, которые нуждаются в уменьшенной концентрации (низком парциальном давлении) свободного кислорода, т.к. их ферменты инактивируются при контакте с сильными окислителями (например, гидрогеназы).



2. Obligatные анаэробы. Не используют кислород для получения энергии. Тип метаболизма у них преимущественно бродильный. Бывают строгие анаэробы и **аэротолерантные**. Строгие анаэробы погибают в присутствии кислорода.

Аэротолерантные анаэробы не используют кислород для получения энергии, но могут существовать в его атмосфере.

3. Факультативные анаэробы обладают смешанным типом метаболизма. Процесс получения энергии у них может происходить кислородным дыханием и брожением.

В процессе аэробного дыхания образуются токсические продукты окисления (H_2O_2 - перекись водорода, $\cdot O_2$ - свободные кислородные радикалы), от которых защищают специфические ферменты, прежде всего *каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза*. У анаэробов эти ферменты отсутствуют, также как и *система регуляции окислительно-восстановительного потенциала (rH_2)*.

Рост и размножение

- Под ***ростом*** бактерий понимают увеличение массы клеток без изменения их числа в популяции как результат скоординированного воспроизведения всех клеточных компонентов и структур.
- Увеличение числа клеток в популяции микроорганизмов обозначают термином «***размножение***». Оно характеризуется двумя параметрами: *временем генерации* (интервал времени, за который число клеток удваивается) и таким понятием, как *концентрация бактерий* (КОЕ* на 1 мл или г).

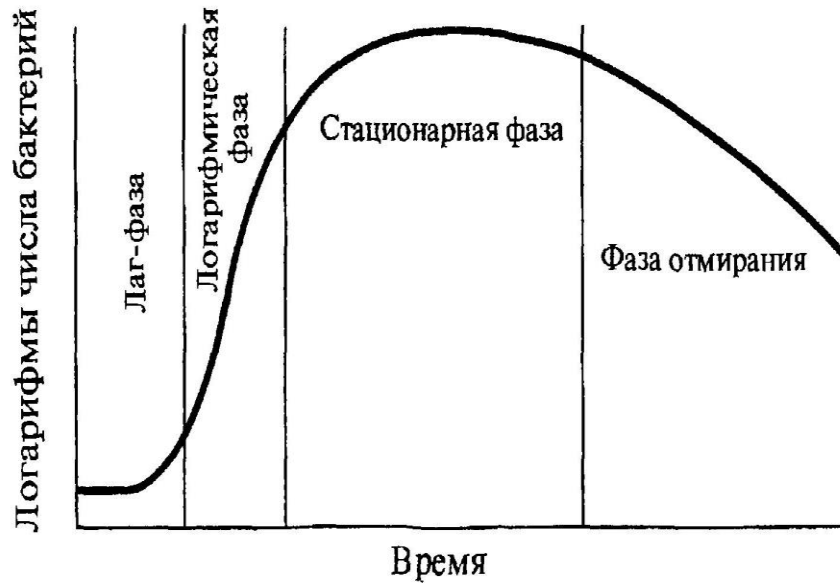
*КОЕ – колониеобразующая единица (КОЕ/мл; КОЕ/г)

- Бактерии, засеянные в определённый, но не изменяющийся объём жидкой питательной среды, размножаясь, потребляют питательные элементы. Что в дальнейшем приводит к истощению питательной среды и прекращению роста бактерий. Культивирование бактерий в замкнутой системе называют *периодическим*, а культуру – *периодической*. Рост периодической культуры бактерий подразделяют на несколько фаз, или периодов.

Фазы роста бактериальной популяции. Периодические культуры.

- - лаг- фаза (начальная стадия адаптации с медленным темпом прироста биомассы бактерий) период между посевом бактерий и началом их размножения, длится в среднем 2-5 часов; бактерии при этом увеличиваются в размерах и готовятся к делению, повышается количество нуклеиновых кислот, белка и других компонентов клетки.
- - экспоненциальная (геометрического роста) фаза с резким ростом численности популяции микроорганизмов (2^n в степени n); является периодом интенсивного деления бактерий продолжительностью около 5-6 часов.

- - стационарная фаза (фаза равновесия размножения и гибели микробных клеток);
- - фаза гибели - уменьшение численности популяции в связи с уменьшением и отсутствием условий для размножения микроорганизмов (дефицит питательных веществ, изменение рН, rH_2 , концентрации ионов и других условий культивирования). Характеризуется отмиранием клеток в условиях истощения источников питательной среды и накопления в ней продуктов метаболизма бактерий. Продолжительность этой фазы колеблется от десятков часов до нескольких недель.



Фазы размножения бактерий.

- - лаг- фаза (начальная стадия адаптации с медленным темпом прироста биомассы бактерий);
- - экспоненциальная (геометрического роста) фаза с резким ростом численности популяции микроорганизмов ;
- - стационарная фаза (фаза равновесия размножения и гибели микробных клеток);
- - стадия гибели - уменьшение численности популяции в связи с уменьшением и отсутствием условий для размножения микроорганизмов

Непрерывное культивирование

Если условия культивирования поддерживаются путём дозирования питательных веществ, контроля плотности бактериальной суспензии и удалением метаболитов, то культура находится в логарифмической фазе роста и называется *непрерывной*.

Непрерывное культивирование применяется в промышленных условиях для получения биомассы бактерий в биотехнологических процессах.

Условия культивирования

- 1.Использование всех необходимых для соответствующих микробов питательных компонентов.
- 2.Оптимальные температура, рН, rH_2 , концентрация ионов, степень насыщения кислородом, газовый состав и давление.

Микроорганизмы культивируют на питательных средах при оптимальной температуре в термостатах, обеспечивающих условия инкубации.

Культивирование микроорганизмов

Метод культивирования	Микроорганизмы
In vivo: ■ Культура клеток ■ Птичий эмбрион ■ Организм животного	Облигатные паразиты: ■ Риккетсии ■ Хламидии ■ Вирусы
In vitro: ■ Искусственные питательные среды	Почти все патогенные бактерии

Бактериологический метод

- включает в себя выделение чистой культуры возбудителя с последующей идентификацией его по культуральным, биохимическим, антигенным и ряду других свойств. При этом возможно установить чувствительность выделенного агента к тем или иным химиотерапевтическим препаратам и бактериофагам.
- Бактериологический метод является основным для постановки этиологического диагноза при большинстве инфекционных заболеваний, внутрибольничных инфекций, бактериальных осложнений.

Характеристика бактериологического метода диагностики

- Бактериологический метод диагностики основан на выделении чистой культуры бактерий и идентификации ее по свойствам в лабораторных условиях.

Идентификация – установление видовой принадлежности микроорганизма.

С этой целью определяют морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические и антигенные свойства.

- Чистая культура- популяция одного вида микроорганизмов, выделенная на питательной среде.
- Колония – видимая простым глазом изолированная структура, образующаяся в результате размножения и накопления бактерий за определенный срок инкубации.
Колония – это потомство 1 родительской клетки (КОЕ)

- 
- Основной и главный принцип бактериологии – во избежание ошибок изучать свойства только чистых, однородных культур.
 - Каждая выделенная культура данного вида бактерий называется также **штаммом**, т.е. конкретным образцом данного вида (*нем. stammen* – происходить).