

Тема: Поступление питательных веществ в клетку.

Ферменты бактерий

Методы выделения чистых культур

микроорганизмов.

Методы определения количества бактерий.



микроорганизмов имеет ряд особенностей:

1. Поступление питательных веществ в микробную клетку происходит через всю ее поверхность.
 2. Микробная клетка обладает исключительной быстротой метаболических реакций;
 3. Микроорганизмы способны довольно быстро адаптироваться к изменяющимся условиям среды обитания.
- Основным регулятором и селективно проницаемым барьером является цитоплазматическая мембрана.
 - Питательные вещества могут проникать в цитоплазму микробных клеток только в виде небольших молекул и в растворенном виде.
 - *Сложные органические вещества* (белки, полисахариды и др.) предварительно подвергаются воздействию ферментов-гидролаз, выделяемых микробной клеткой, и после этого становятся доступными для использования.

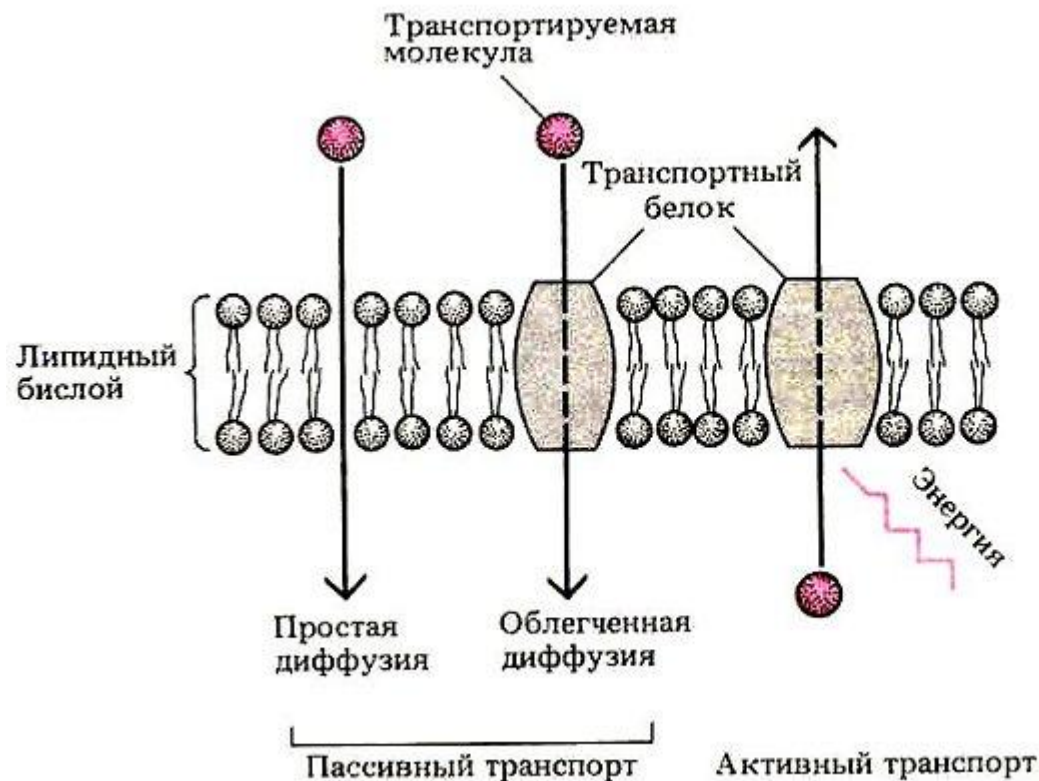
Транспорт питательных веществ в клетку

Без затрат энергии
(по градиенту
концентрации)

С использованием энергии
(против градиента
концентрации)

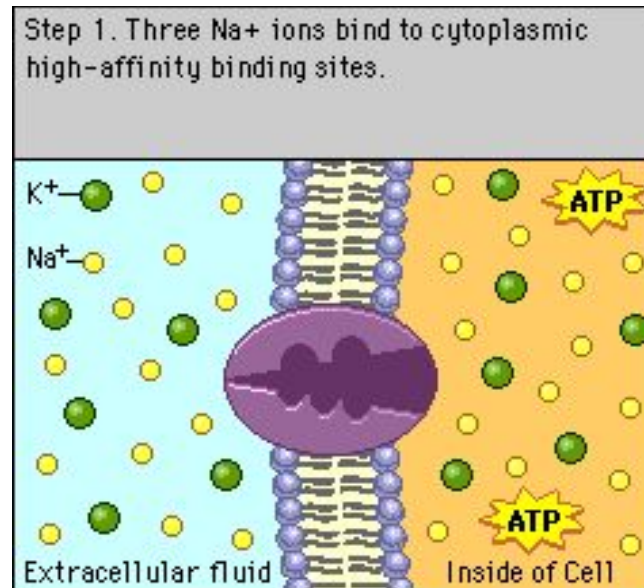
Простая
диффузия

Облегченная
диффузия



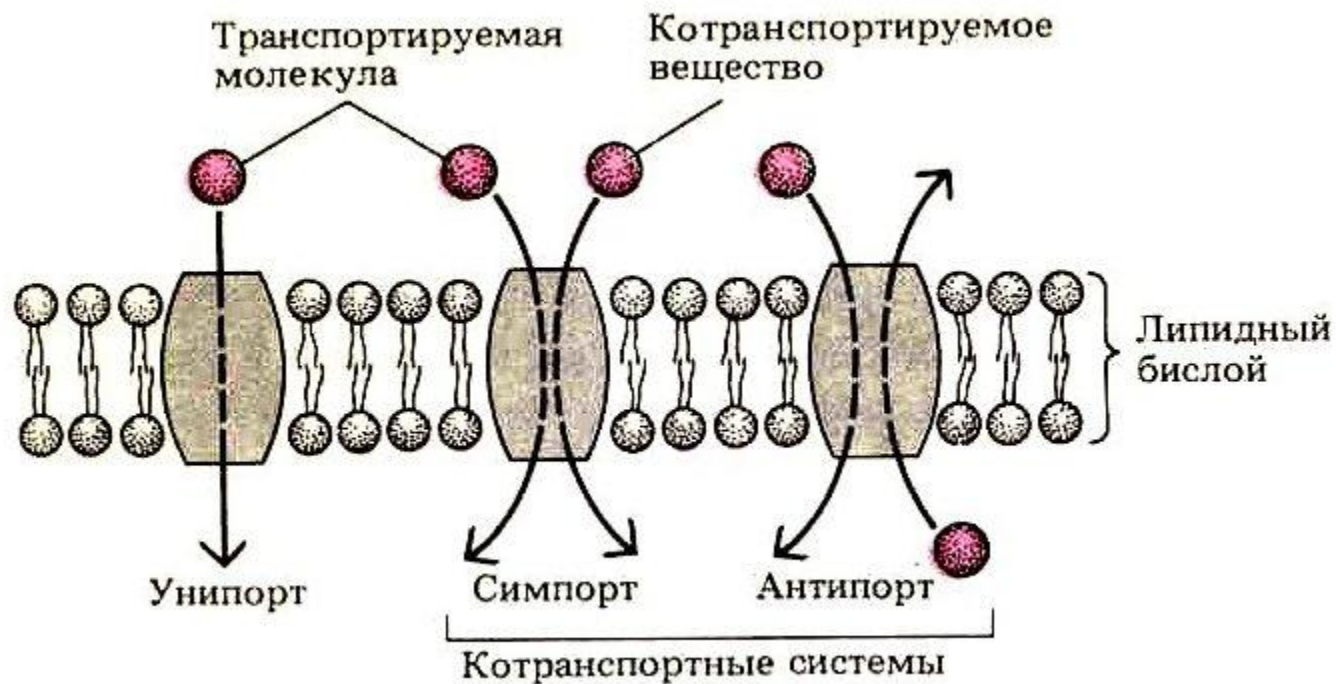
Транспорт питательных веществ в клетку

- Основным механизмом избирательного переноса веществ через ЦПМ прокариот является активный транспорт, позволяющий "накачивать" в клетку молекулы и ионы против их концентрационных и электрических градиентов.
- **Первичный активный транспорт** – осуществляется с использованием АТФ



Транспорт питательных веществ в клетку

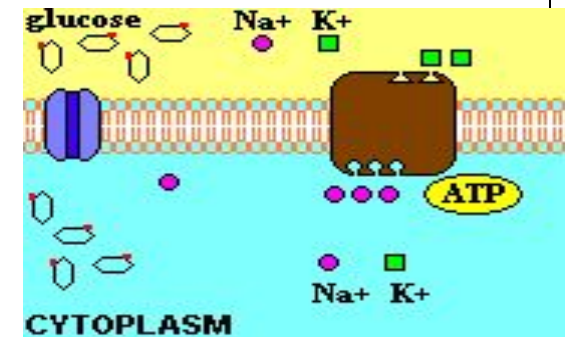
- **Котранспорт** – транспорт одного вещества через мембрану связан с транспортом другого вещества, в том же самом или в противоположном направлении.



Транспорт питательных веществ в клетку

Вторичный активный транспорт.

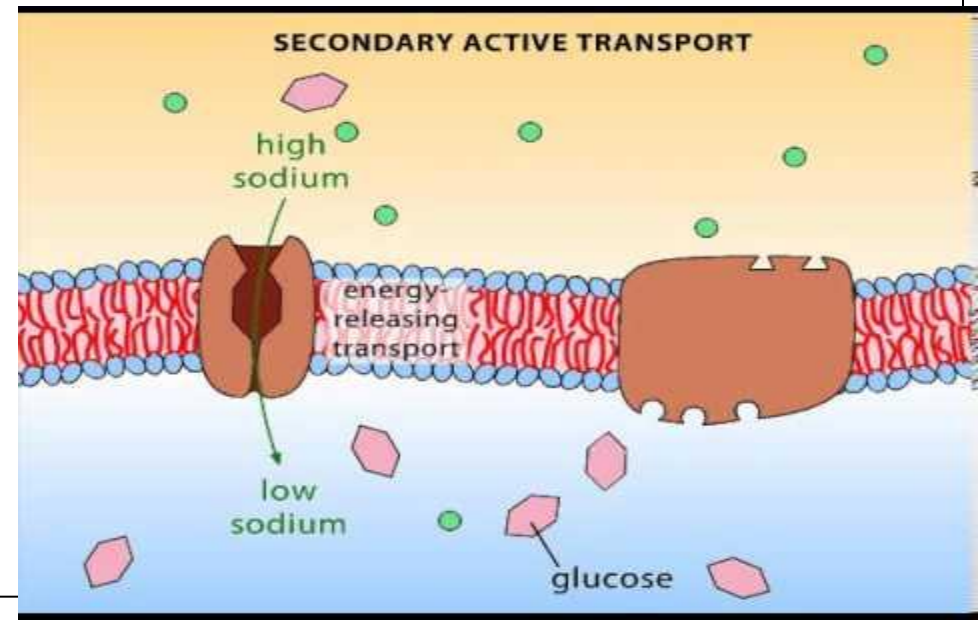
- Системы *вторичного активного транспорта* одновременно переносят два вещества - одно по электрохимическому градиенту, другое против него.
- Тем самым, они используют для своей работы градиент, ранее сгенерированный белками первичного транспорта.
- Активный транспорт используется для переноса в клетки большинства субстратов – аминокислот, витаминов, некоторых углеводов, а также для выкачивания из клеток антибиотиков и других чужеродных низкомолекулярных веществ (ксенобиотиков).



Транспорт питательных веществ в клетку

Вторичный активный транспорт.

- На примере транспорта глюкозы: имеется белок – насос, перекачивающий глюкозу.
- Это трансмембранный белок, который осуществляет транспорт глюкозы с той стороны мембраны, где концентрация ионов натрия велика, на ту сторону, где она низка, хотя у самого его нет никакого предпочтительного направления именно переноса глюкозы.
- Работа этого насоса идет без всякой затраты энергии.
 - Однако сам транспорт глюкозы идет с затратой энергии, поскольку энергия тратится на создание самой разницы в концентрациях ионов натрия посредством натрий-калиевого насоса.



Транспорт питательных веществ в клетку

- Транспорт, сопряженный с фосфорилированием субстрата (фосфотрансферные системы)-
- Транспорт углеводов у бактерий часто осуществляется с использованием **фосфотрансферных систем**, которые не встречаются у эукариот.
- Они осуществляют трансмембранный перенос с одновременным фосфорилированием переносимого субстрата.
- Фосфорилированные углеводы не могут быть перенесены из клетки обратно и сразу же включаются в метаболизм бактерии.
- Донором фосфатной группы в данных системах выступают высокоэнергетические молекулы фосфоенолпирувата – промежуточного продукта гликолиза.

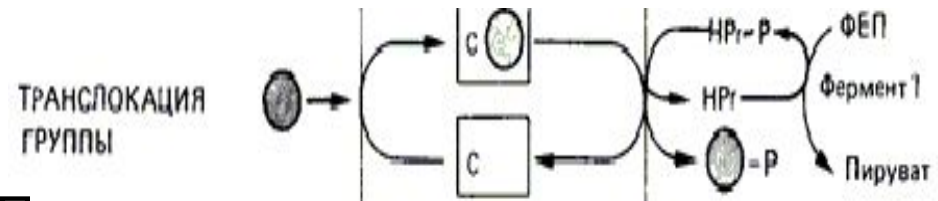
Фермент I

Фосфоенолпируват + HPr ----- \gg HPr-P + Пируват

Фермент II

$\text{HPr} + \text{Сахар}$ ----- *- Сахар-Я+ HPr

Фермент II, вероятно, выполняет функцию пермеазы и фосфотрансферазы одновременно

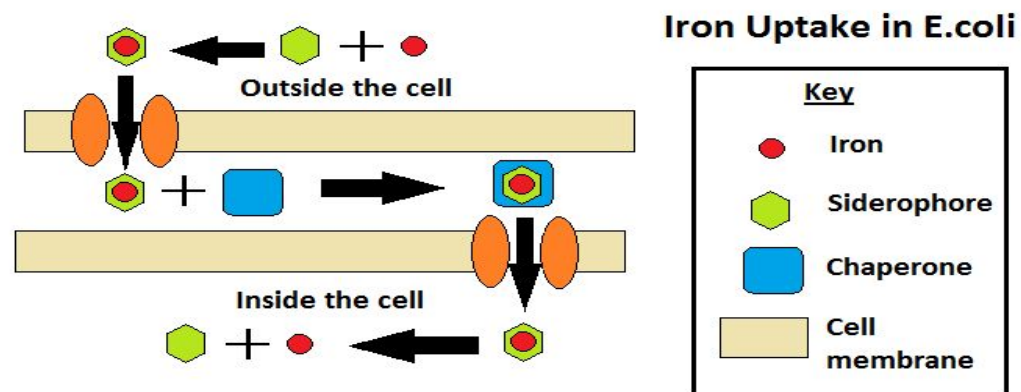
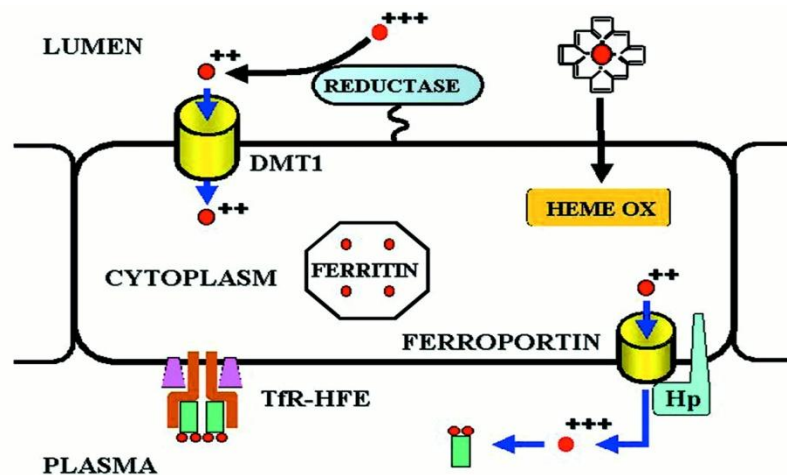


Транспорт питательных веществ в клетку

- *Грамотрицательные бактерии* помимо цитоплазматической мембраны содержат дополнительный липидный барьер - внешнюю мембрану.
- Её проницаемость регулируется менее тщательно, чем в случае цитоплазматической мембраны: в её составе содержатся белки **порины**, которые свободно пропускают низкомолекулярные гидрофильные вещества.
- Для транспорта крупных молекул внешняя мембрана, как и цитоплазматическая, содержит специфические системы пассивного и активного транспорта.
- Аналоги поринов также осуществляют транспорт и через внешний липидный слой *кислотоустойчивых бактерий*.

Транспорт питательных веществ в клетку. Получение железа.

- Самым распространенным механизмом получения железа у бактерий-возбудителей заболеваний человека является синтез **сидерофоров** – низкомолекулярных веществ, способных образовывать прочные комплексы с ионами железа, конкурируя с человеческими белками-переносчиками, и впоследствии селективно транспортироваться в бактериальную клетку.
- Эффективность получения железа патогенными бактериями соотносится с их агрессивностью



КЛАССИФИКАЦИЯ

- ❑ **По механизму действия:**
 - ❑ оксиредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы

- ❑ **По месту реализации активности:**
 - ❑ Экзоферменты (гидролазы, вызывающие гидролиз белков, жиров, углеводов до более простых соединений, которые могут быть усвоены микробной клеткой)
 - ❑ Эндоферменты (участвуют в реакциях обмена веществ, происходящих внутри клетки)

- ❑ **По времени синтеза в клетке:**
 - ❑ Конституитивные (присутствуют постоянно, например, ферменты, обеспечивающие клеточный метаболизм)
 - ❑ Индуцибельные, адаптивные (синтезируются только при наличии субстрата)

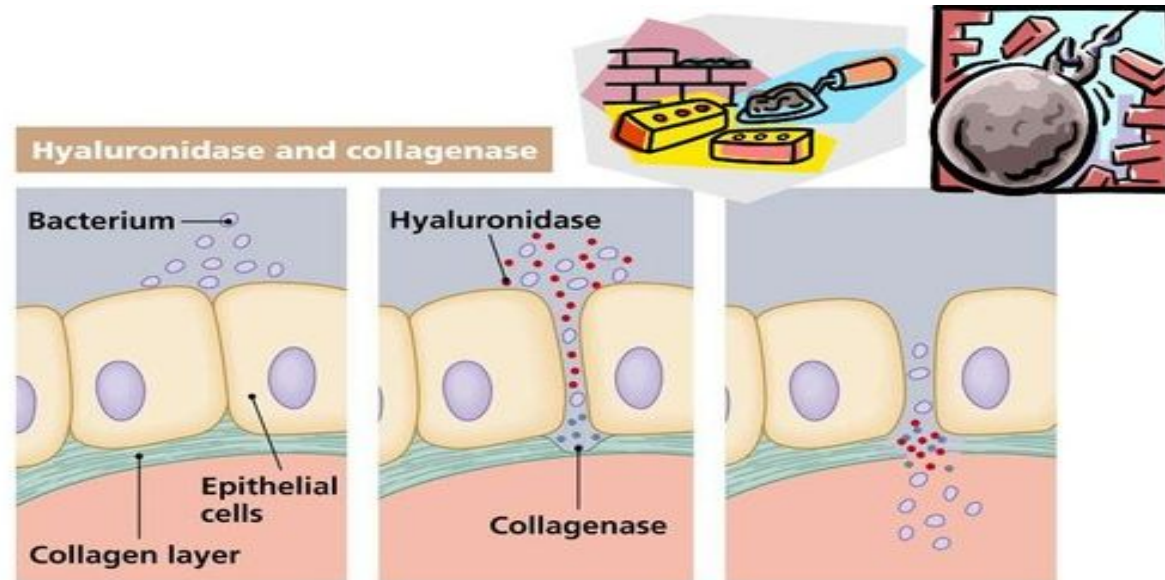
ФЕРМЕНТЫ БАКТЕРИЙ. КЛАССИФИКАЦИЯ

- ❑ По природе субстрата:
 - Протеолитические
 - Липолитические
 - Сахаролитические (имеют наибольшее значение для идентификации бактерий)

ФЕРМЕНТЫ АГРЕССИИ

- Внеклеточные гидролазы, обеспечивающие клетку питательными веществами, можно рассматривать как ферменты агрессии
- Они служат для преодоления естественных защитных барьеров макроорганизма и являются *факторами патогенности*.
- К таким ферментам относятся *протеазы, липазы (лецитиназа), гиалуронидаза, дезоксирибонуклеаза, и др.*

Например, гиалуронидаза расщепляет межклеточное вещество соединительной ткани (гиалуроновую кислоту) и тем самым способствует распространению возбудителя в макроорганизме



ФЕРМЕНТЫ БАКТЕРИЙ.

- **Ферментный состав** любого микроорганизма является достаточно постоянным признаком, а различные виды микроорганизмов довольно четко различаются по набору ферментов.
- Изучение спектра ферментативной активности выделенной чистой культуры имеет важное значение для дифференциации и составляет основу биохимической идентификации различных микроорганизмов.



РОСТ И РАЗМНОЖЕНИЕ

- **РОСТ** –под ростом бактерий понимают увеличение массы клеток без изменения их числа в популяции как результат скоординированного воспроизведения всех клеточных компонентов и структур.
- Достижение клеткой определенной массы – сигнал к началу деления
- **РАЗМНОЖЕНИЕ** –увеличение во времени числа клеток микроорганизмов в питательной среде.

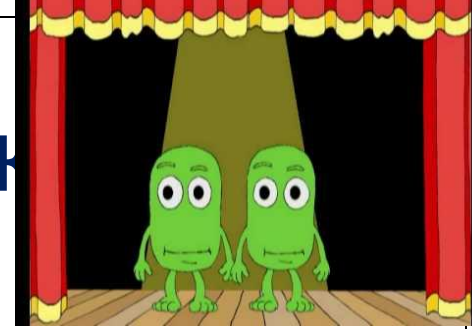
Изменение численности популяции микроорганизмов выражается кривой роста.

Деление бактериальной клетки

- *Размножение большинства бактерий идет путем бинарного (поперечного) деления:*
- после удвоения нуклеоиды, связанные с плазматической мембраной, расходятся за счет растяжения мембраны между нуклеоидами,
- затем образуется перетяжка или септа, делящая клетку надвое.
- Этот тип деления приводит к очень точному распределению генетического материала, практически без ошибок (менее 0,03 % дефектных клеток).



Деление бактериальной клетки



- В начале синтеза ДНК, который начинается с точки репликации (origin), обе растущие молекулы ДНК изначально остаются связанными с плазматической мембраной.
- Одновременно с синтезом ДНК происходит процесс снятия сверхспирализации как старых, так и реплицирующихся петлевых доменов за счет целого ряда ферментов (топоизомеразы, гиразы, лигазы и др), что приводит к физическому обособлению двух дочерних (или сестринских) хромосом-нуклеоидов, которые еще находятся в тесном контакте друг с другом.
- После такой сегрегации нуклеоидов происходит их расхождение от центра клетки, от места их бывшего расположения.
- Причем это расхождение очень точное: на четверть длины клетки в двух противоположных направлениях.
- В результате этого в клетке располагаются два новых нуклеоида.

Культивирование бактерий

1. Культивирование на твердых питательных средах (**поверхностный способ** выращивания)

2. Культивирование в большом объеме жидкой фазы, содержащей все необходимые для нормального роста и развития микроорганизма питательные вещества (**глубинный способ** выращивания).

Все процессы культивирования в жидкой среде можно разделить на две большие группы - *периодические и непрерывные*.

Периодический метод культивирования

- Периодический метод культивирования предусматривает внесение посевного материала в питательную среду (инокуляция клетками среды) в начале процесса и получение культуры по достижении заданной фазы развития популяции.
- Периодическую культуру можно рассматривать как замкнутую систему (в какой-то мере подобную многоклеточному организму), которая в своем развитии проходит четыре фазы-начальную, экспоненциальную, стационарную и фазу отмирания (юность, расцвет, старение и смерть). Условия существования культуры во всех этих фазах различны.

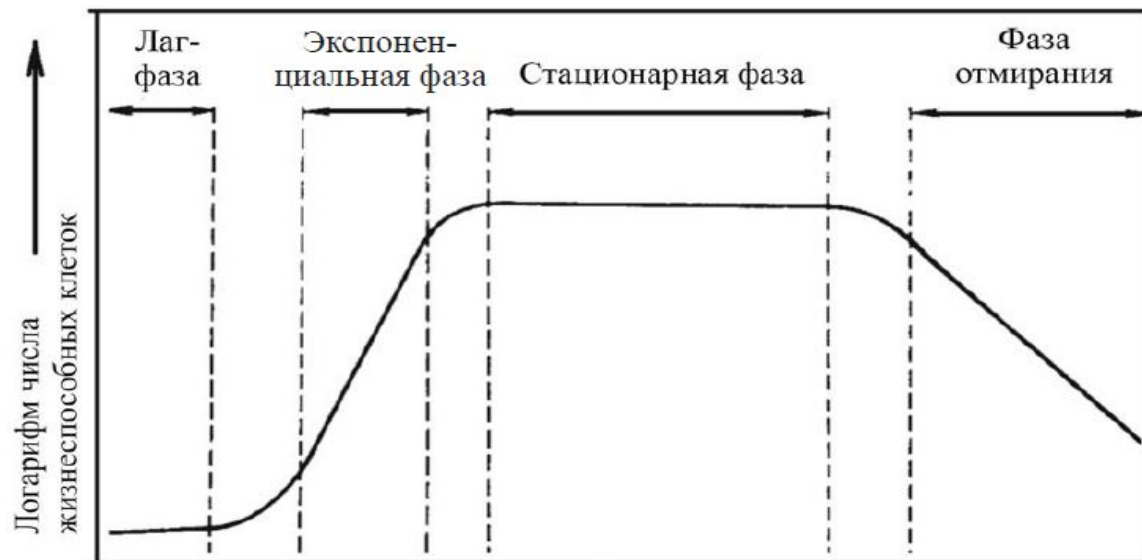
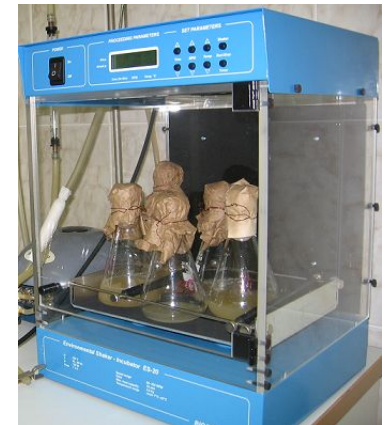


Рис. 1. Основные фазы кривой роста периодической культуры микроорганизмов

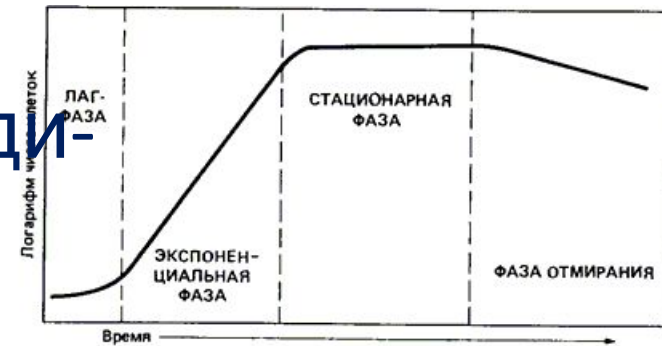


Характеристика фаз роста периодической бактериальной культуры



- ❑ **ЛАГ фаза:** - адаптация культуры, синтез индуцибельных ферментов
 - ❑ средняя длительность фазы для большинства бактерий 4 часа (2-5), для лептоспир – от 3 до 5 дней
 - ❑ активные биосинтетические процессы (количество рибосом максимально)
 - ❑ несколько нуклеоидов
- ❑ **Экспоненциальная (логарифмическая) фаза:**
 - ❑ постоянная максимальная скорость деления клеток
 - ❑ культура состоит из стандартных клеток
 - ❑ клеточная стенка тонкая, количество рибосом минимально нуклеоид один
 - ❑ высокая чувствительность к химическим и физическим воздействиям
 - ❑ максимальная иммуногенность

Характеристика фаз роста периодической бактериальной культуры



□ Стационарная фаза:

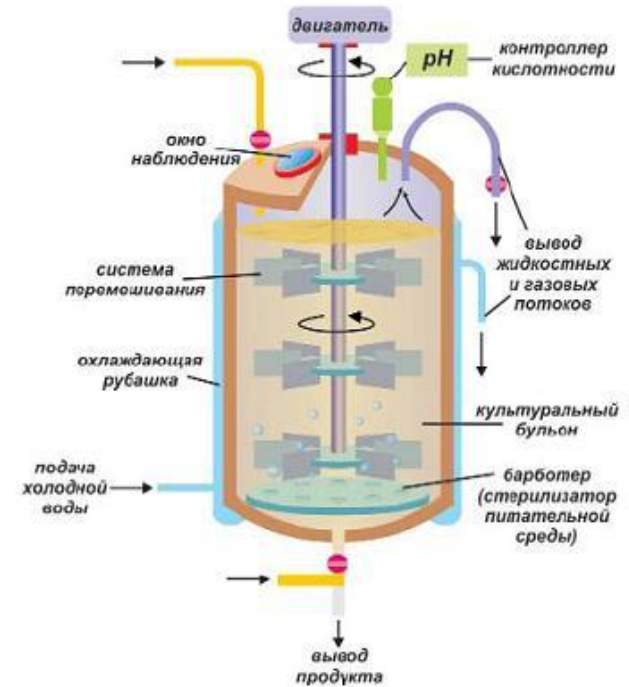
- снижение скорости роста из-за увеличения плотности бактериальной популяции, накопления токсических продуктов и уменьшения концентрации питательных веществ
- продолжительность несколько часов
- толстая клеточная стенка, изменение размеров и морфологии клетки
- устойчивость к внешним воздействиям.

□ Фаза отмирания:

- лизис клеток под влиянием собственных ферментов (аутолиз)
- продолжительность от десятка часов до нескольких недель

Непрерывный метод культивирования

- ❑ Осуществляется в ферментерах
- ❑ Обычный ферментер представляет собой закрытый цилиндр, в котором механически перемешиваются среда вместе с микроорганизмами.
- ❑ Через него прокачивают воздух, иногда насыщенный кислородом. Температура регулируется с помощью воды или пара, пропускаемых по трубкам теплообменника. Конструкция ферментера должна позволять регулировать условия роста: постоянную температуру, pH (кислотность или щелочность) и концентрацию растворенного в среде кислорода.
- ❑ По окончании ферментации образуется смесь рабочих микроорганизмов, питательной среды и продуктов биосинтеза.
- ❑ Ее называют культуральной жидкостью или бульоном.



Методы выделения чистых культур бактерий

- Выделение чистой культуры бактерий из исследуемого материала, содержащего, как правило, смесь различных микроорганизмов, является **обязательным этапом бактериологического исследования**, проводимого с различными целями: диагностики заболеваний, определения микробной обсемененности окружающей среды и т.д.
- Для выделения чистой культуры применяют методы, основанные на:
 - 1) **механическом разобщении бактериальных клеток**
 - Метод Дригальского - широко применяется в бактериологической практике
 - Метод Шукевича - применяется для получения чистой культуры протей, обладающего «ползущим» ростом. Посев исследуемого материала производят в конденсационную воду у основания скошенного агара. Подвижные микробы (протей) способны подниматься вверх по скошенному агару, неподвижные формы остаются расти внизу, на месте посева. Пересекая верхние края культуры, можно получить чистую культуру.

Методы выделения чистых культур бактерий

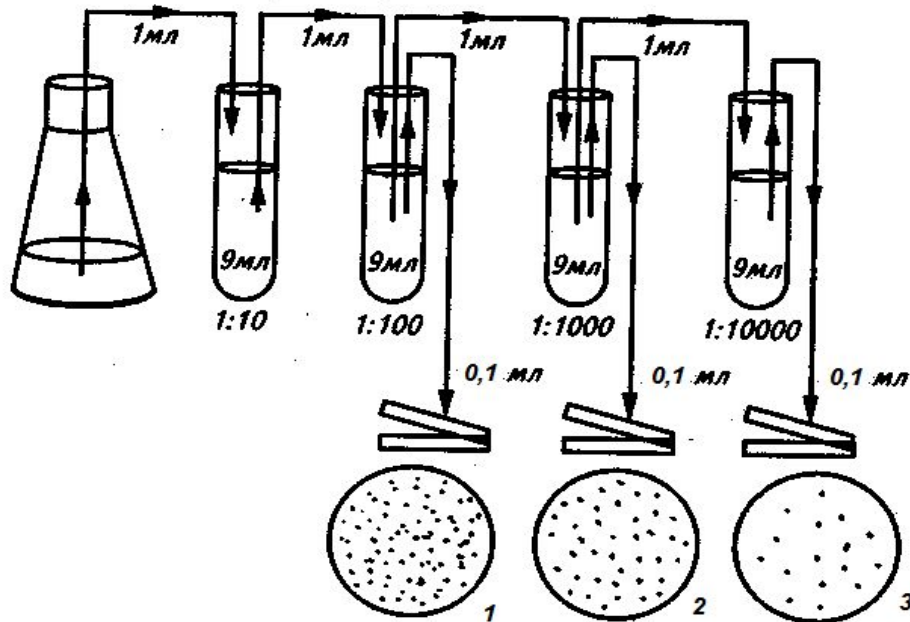
2) Методы, основанные на использовании биологических свойств бактерий

- Использование селективных питательных сред
- Избирательное подавление размножения сопутствующей микрофлоры, основанное на различной чувствительности к антибактериальным препаратам;
- Создание определенных условий (температура, концентрация кислорода) во время инкубации посевов;

3) Методы, основанные на способности некоторых бактерий быстро размножаться в организме чувствительных к ним лабораторных животных (биологический метод)

Определение числа бактерий

- *Общее число* клеток определяется а) путем подсчета клеток под микроскопом в окрашенной мазке б) по бактериальному стандарту (набор эталонов для определения концентрации бактериальных клеток в микробной взвеси по ее мутности; представляет собой запаянные пробирки, содержащие водную взвесь мелких частиц стекла пирекс).
- *Число живых клеток* определяется по числу колоний, образуемых жизнеспособными клетками



В чашке №3 выросло 16 колоний
С учетом разведения и посева 0,1мл
в чашку Петри получаем количество
жизнеспособных бактерий в
исследуемом образце:

$$N = 16 \times 10\,000 \times 10 = 1,6 \cdot 10^6$$