

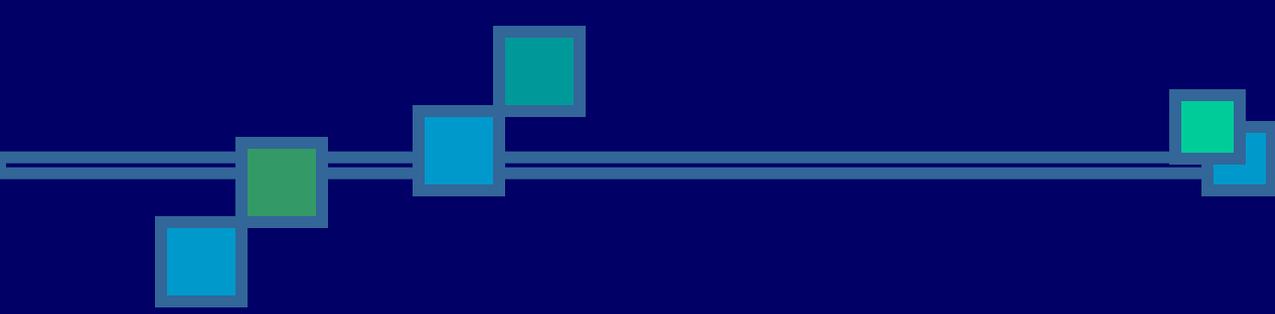


**Энергетический метаболизм
микробов**

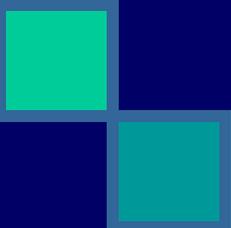
**Роль генома в
метаболической активности
микроорганизмов**

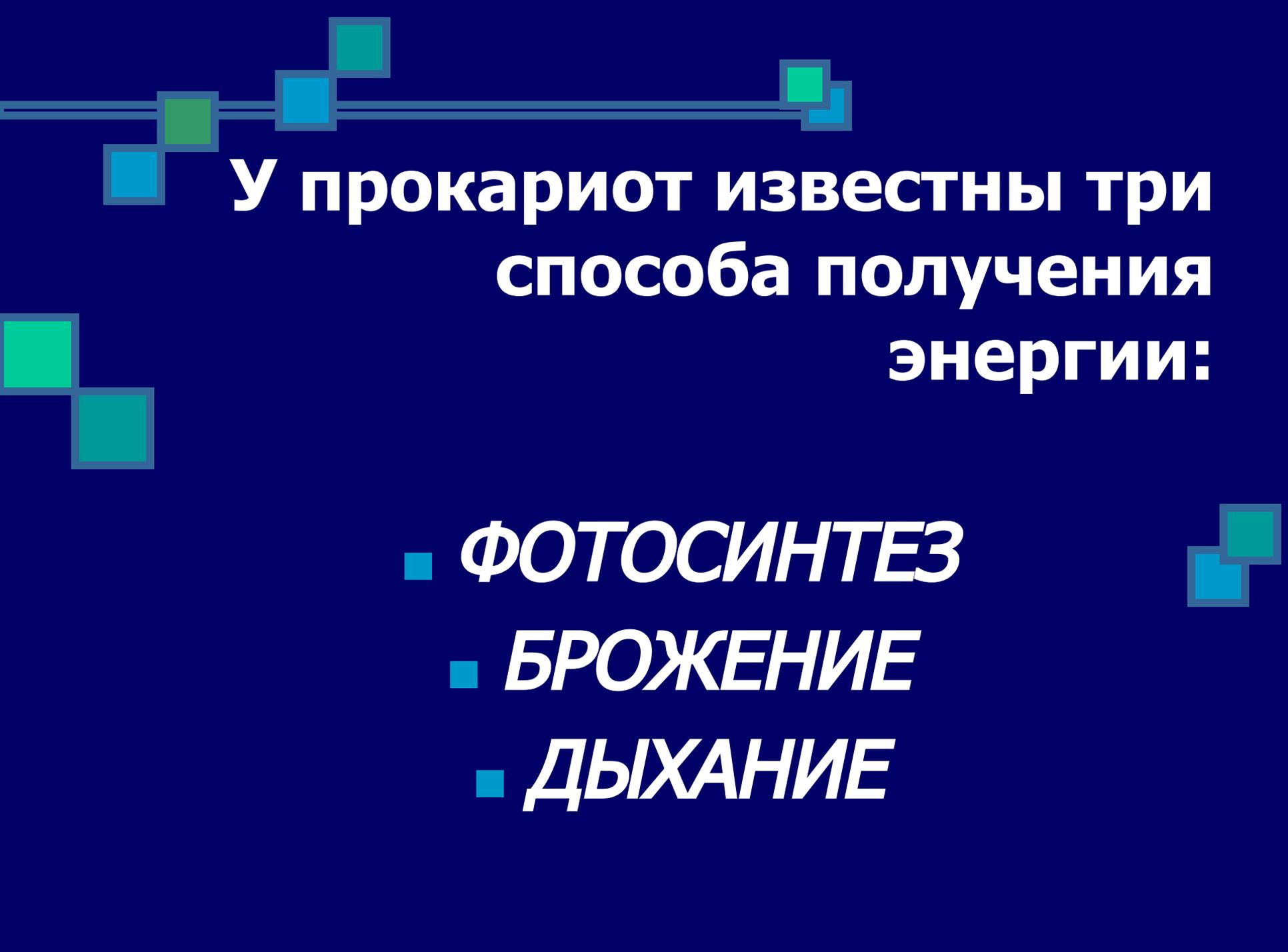


**Особенности
культивирования аэробных и
анаэробных бактерий**



Все процессы
жизнедеятельности
микробной клетки
сопряжены с тратой энергии
и требуют ее возобновления





**У прокариот известны три
способа получения
энергии:**

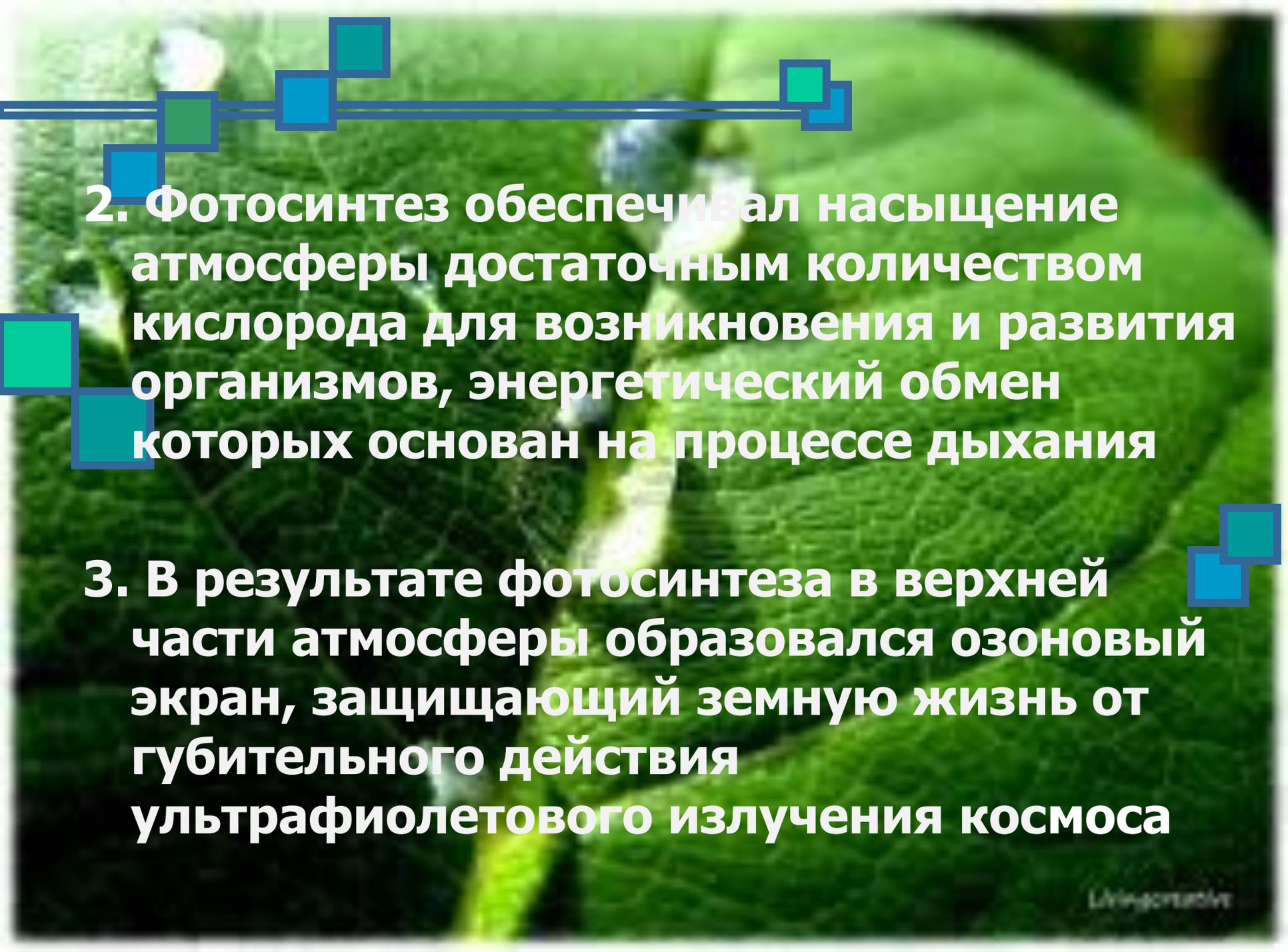
- ***ФОТОСИНТЕЗ***
- ***БРОЖЕНИЕ***
- ***ДЫХАНИЕ***



Значение ФОТОСИНТЕЗА

Фотосинтезирующая деятельность первичных одноклеточных микроорганизмов имела три последствия, оказавшие решающее влияние на всю дальнейшую эволюцию живого

- 1. Фотосинтез освободил организмы от конкуренции за природные запасы abiогенных органических соединений, количество которых значительно сократилось**



2. Фотосинтез обеспечивал насыщение атмосферы достаточным количеством кислорода для возникновения и развития организмов, энергетический обмен которых основан на процессе дыхания

3. В результате фотосинтеза в верхней части атмосферы образовался озоновый экран, защищающий земную жизнь от губительного действия ультрафиолетового излучения космоса



Дыхание микроорганизмов –
сложный процесс, представляющий
собой длинную цепь
последовательных окислительно-
восстановительных реакций с
участием многих ферментов,
которые катализируют реакции
переноса электронов от системы с
наибольшим положительным
потенциалом

Пути окисления веществ у прокариот

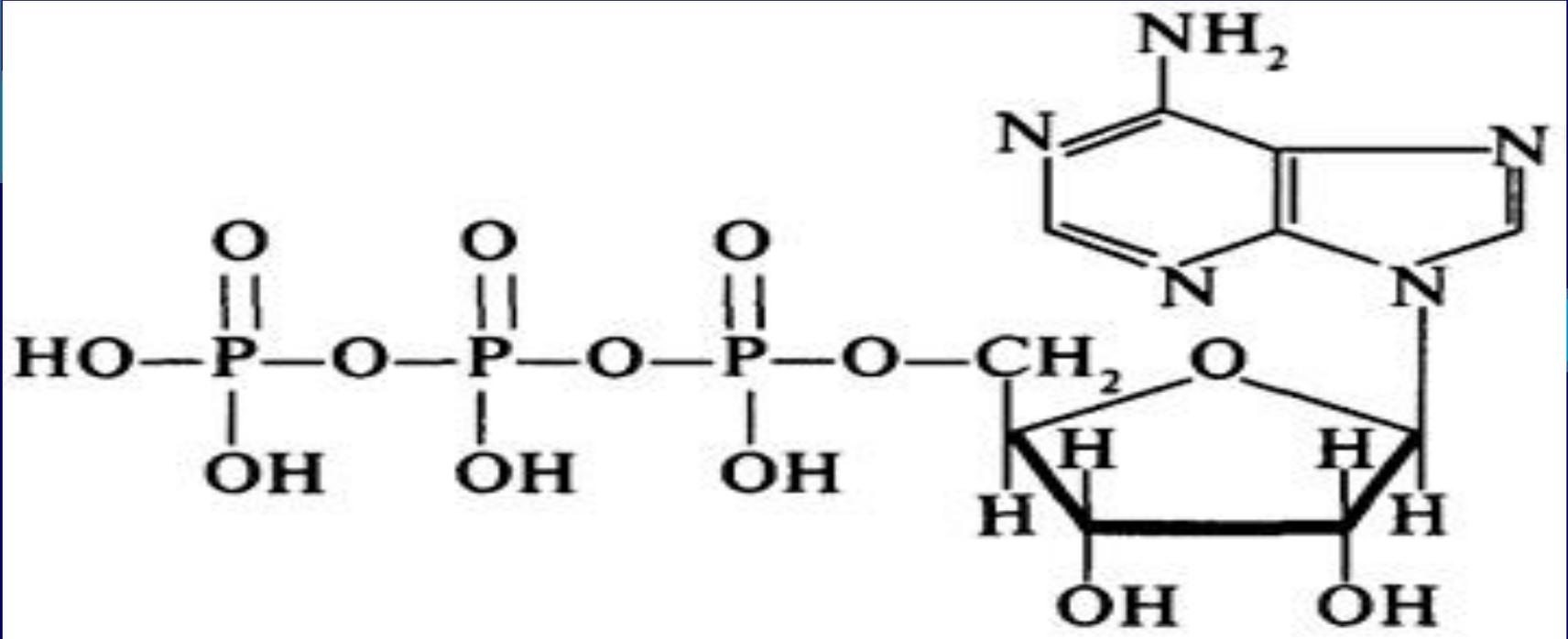
Прямой путь

- при помощи оксидаз происходит непосредственное окисление атмосферным кислородом неорганического субстрата.
- встречается у большинства сапрофитов

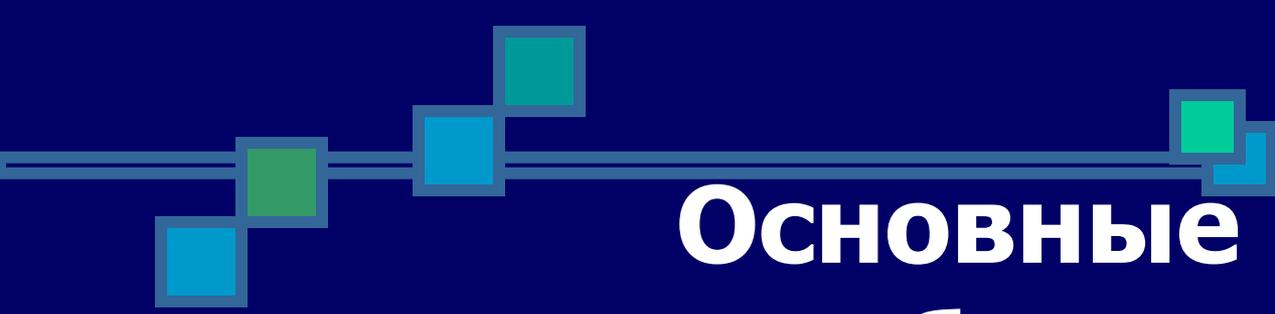
Непрямой путь

- отнятие от субстрата-донора 2-х атомов водорода или 2-х электронов, которые переносятся на другой субстрат-акцептор
- Перенос сопровождается высвобождением энергии, которая аккумулируется в макроэргических фосфатных соединениях (АТФ)

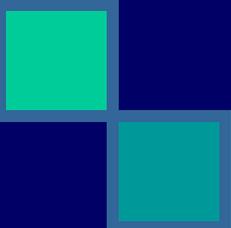
АТФ (аденозинтрифосфат) - «энергетическая валюта» клетки



УНИВЕРСАЛЬНЫЙ АККУМУЛЯТОР ХИМИЧЕСКОЙ ЭНЕРГИИ



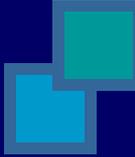
Основные механизмы образования АТФ у прокариот



Окислительное
фосфо-
рилирование

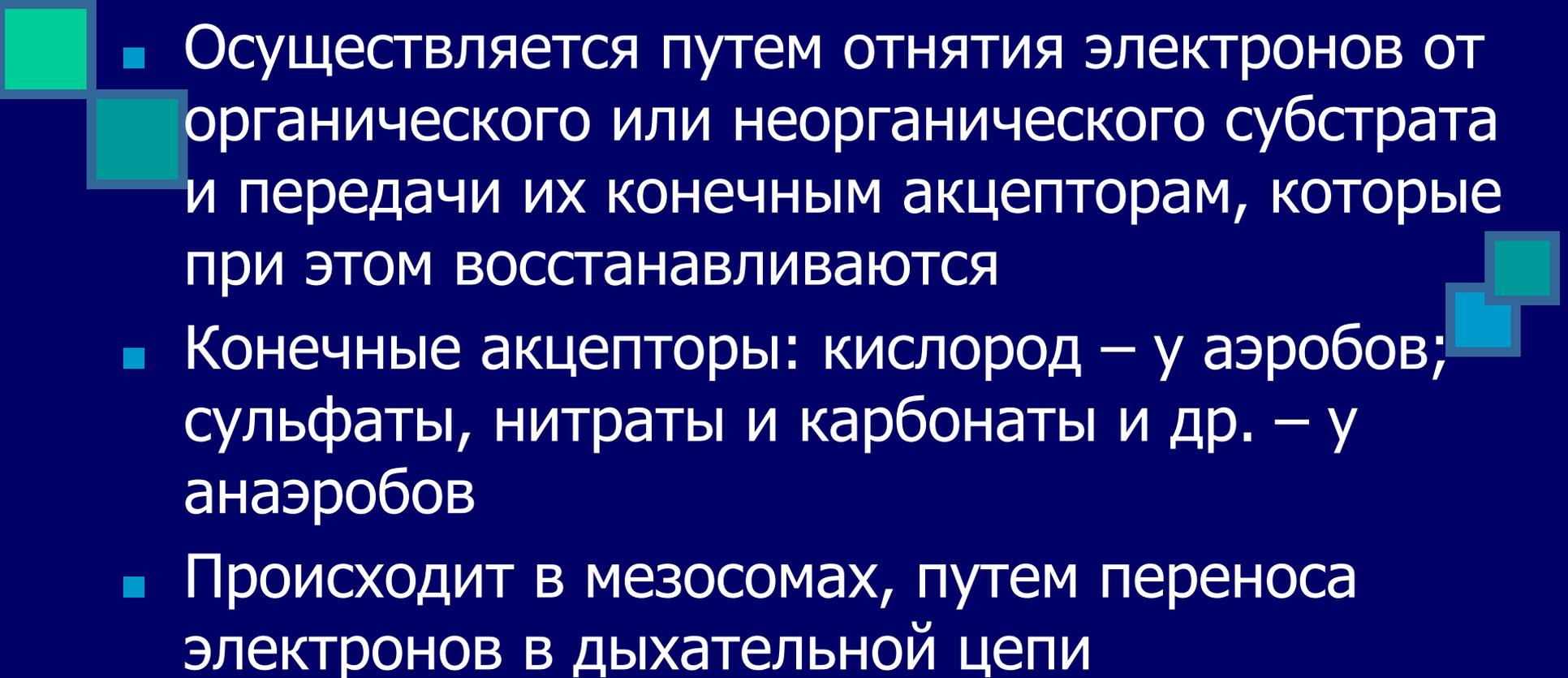


Субстратное
фосфо-
рилирование



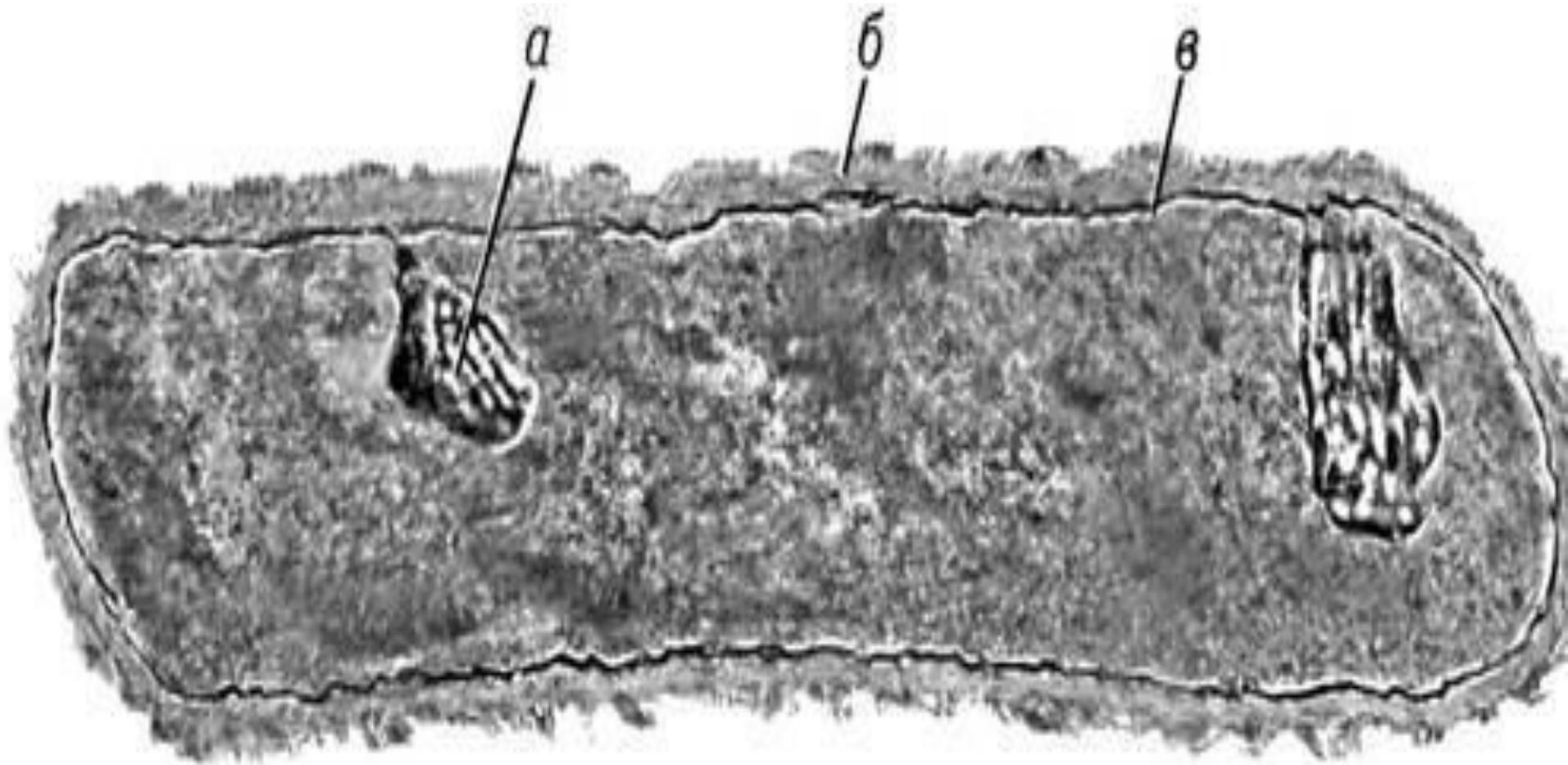


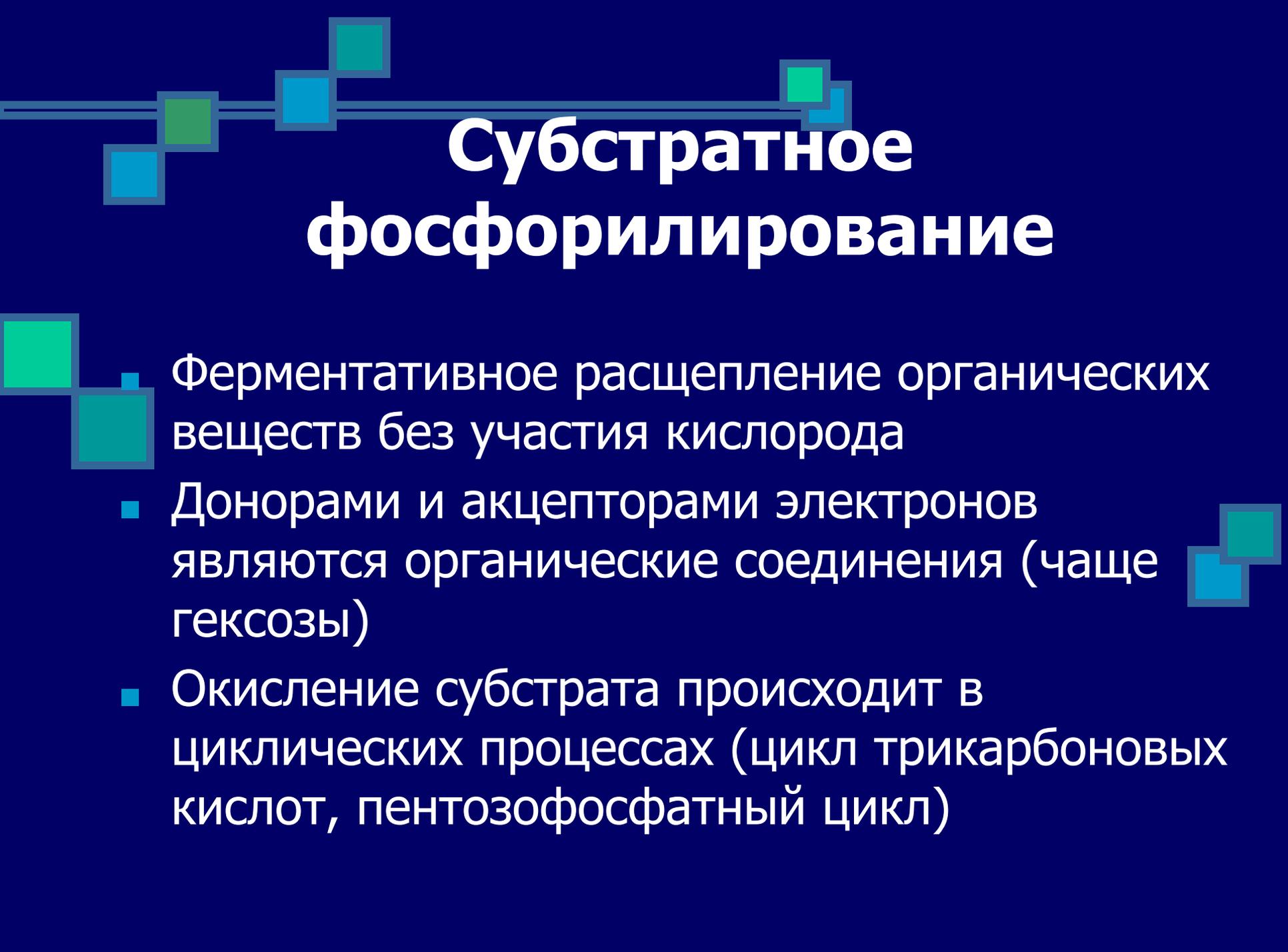
Окислительное фосфорилирование

- Осуществляется путем отнятия электронов от органического или неорганического субстрата и передачи их конечным акцепторам, которые при этом восстанавливаются
 - Конечные акцепторы: кислород – у аэробов; сульфаты, нитраты и карбонаты и др. – у анаэробов
 - Происходит в мезосомах, путем переноса электронов в дыхательной цепи
- 

МЕЗОСОМЫ ПРОКАРИОТ –

локальные впячивания (дивертикулы) ЦПМ





Субстратное фосфорилирование

Ферментативное расщепление органических веществ без участия кислорода

- Донорами и акцепторами электронов являются органические соединения (чаще гексозы)
- Окисление субстрата происходит в циклических процессах (цикл трикарбоновых кислот, пентозофосфатный цикл)

Кислород



СВОБОДНЫЙ -
присутствует в
атмосфере в виде
молекулярного
кислорода (O_2),
объемная доля
которого
составляет 21%

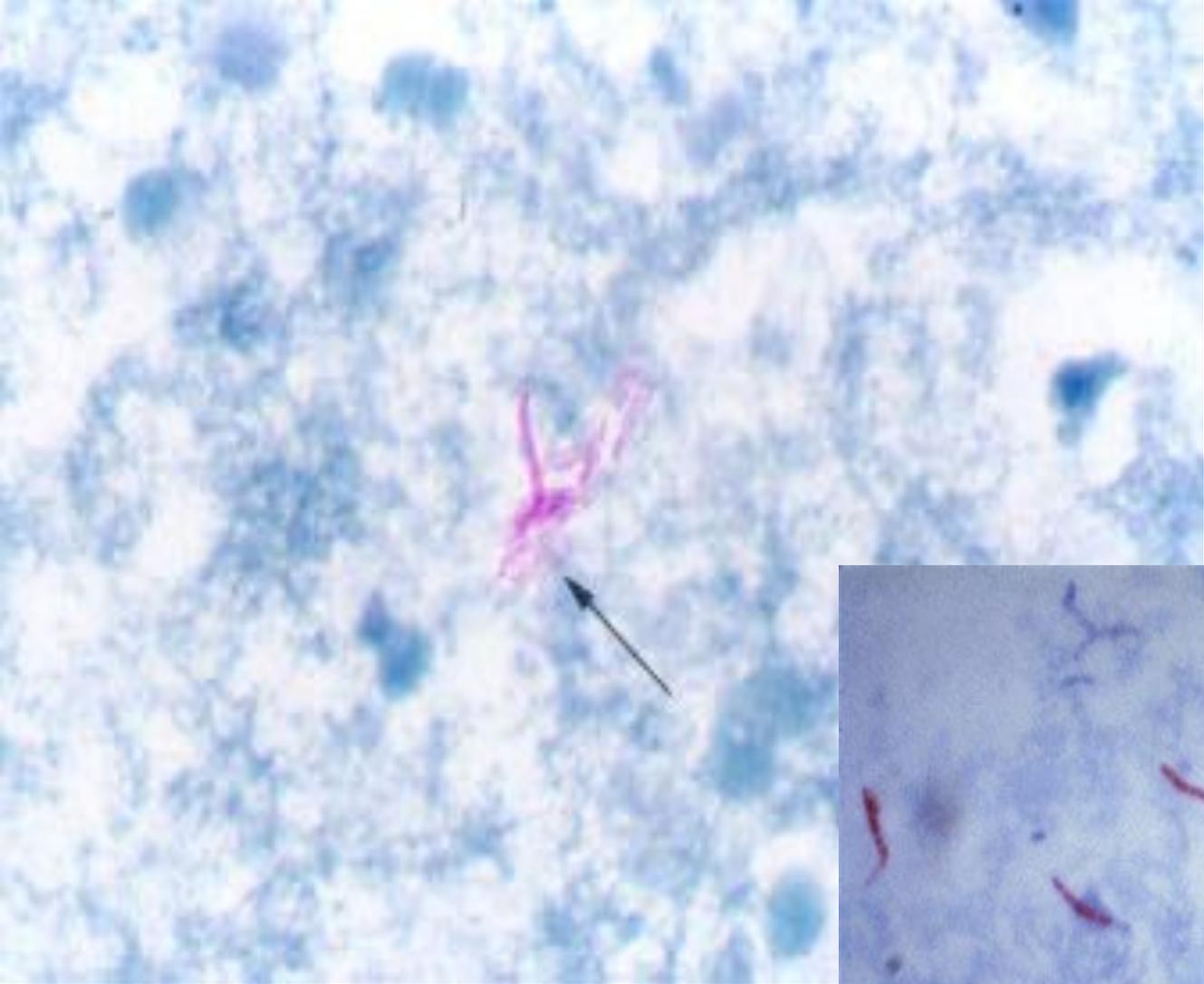
СВЯЗАННЫЙ -
входит в состав
молекул воды,
органических и
неорганических
соединений

Кислород является обязательным химическим компонентом любой клетки. Подавляющее большинство организмов удовлетворяет свои потребности в этом элементе, используя обе формы кислорода

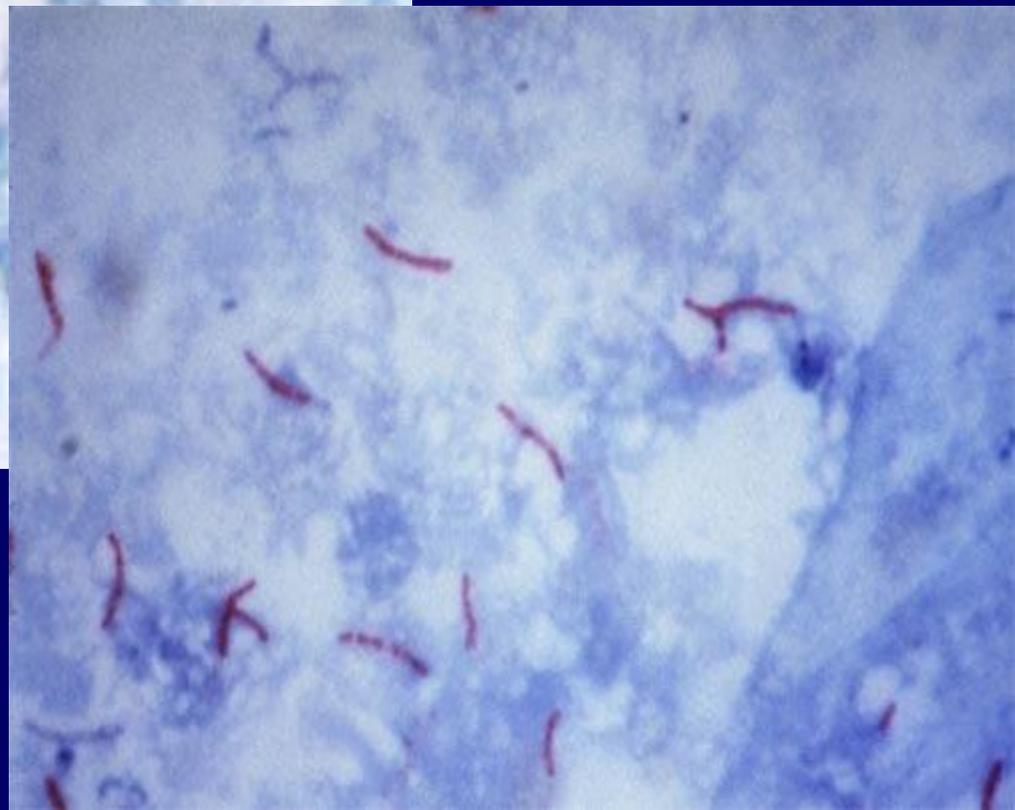
По типу дыхания прокариоты делятся на:

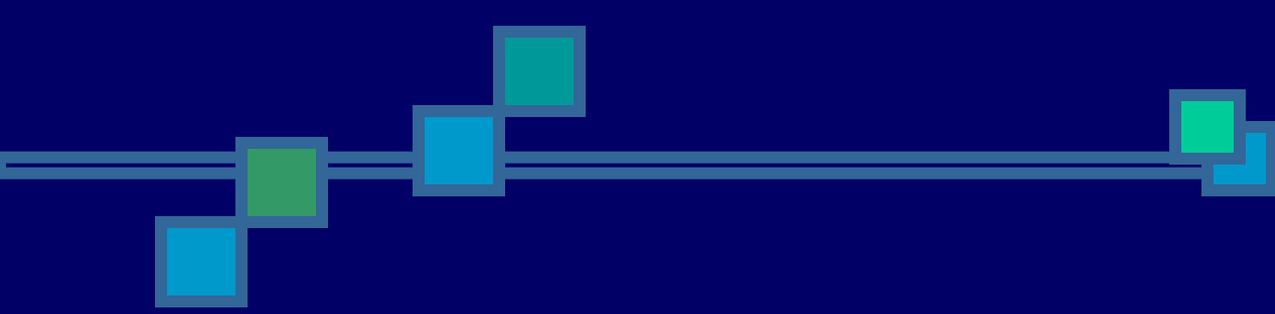
1. Облигатные аэробы – бактерии у которых конечным акцептором водорода (\bar{e}) является свободный молекулярный кислород воздуха (микобактерия туберкулеза)

2. Микроаэрофилы – бактерии-аэробы, у которых рост и размножение оптимальны при сниженном парциальном давлении O^2 , не более 2% (ЛЕПТОСПИРЫ, БОРРЕЛИИ, АКТИНОМИЦЕТЫ)



Micobacterium tuberculosis



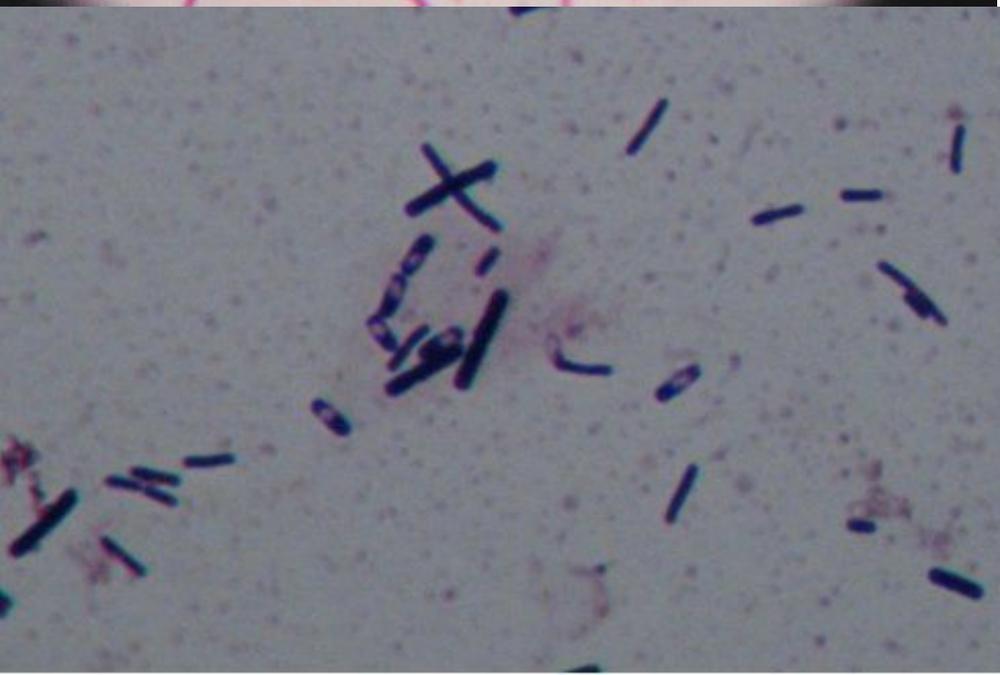
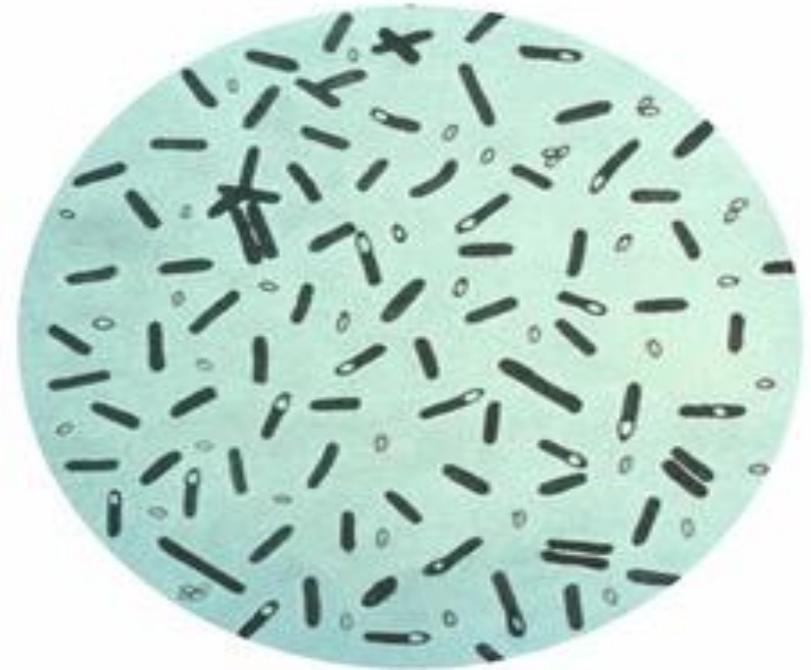
- 
- Бактерии-микроаэрофилы хорошо растущие при повышенном содержании CO_2 называют

«КАПНОФИЛЬНЫМИ»

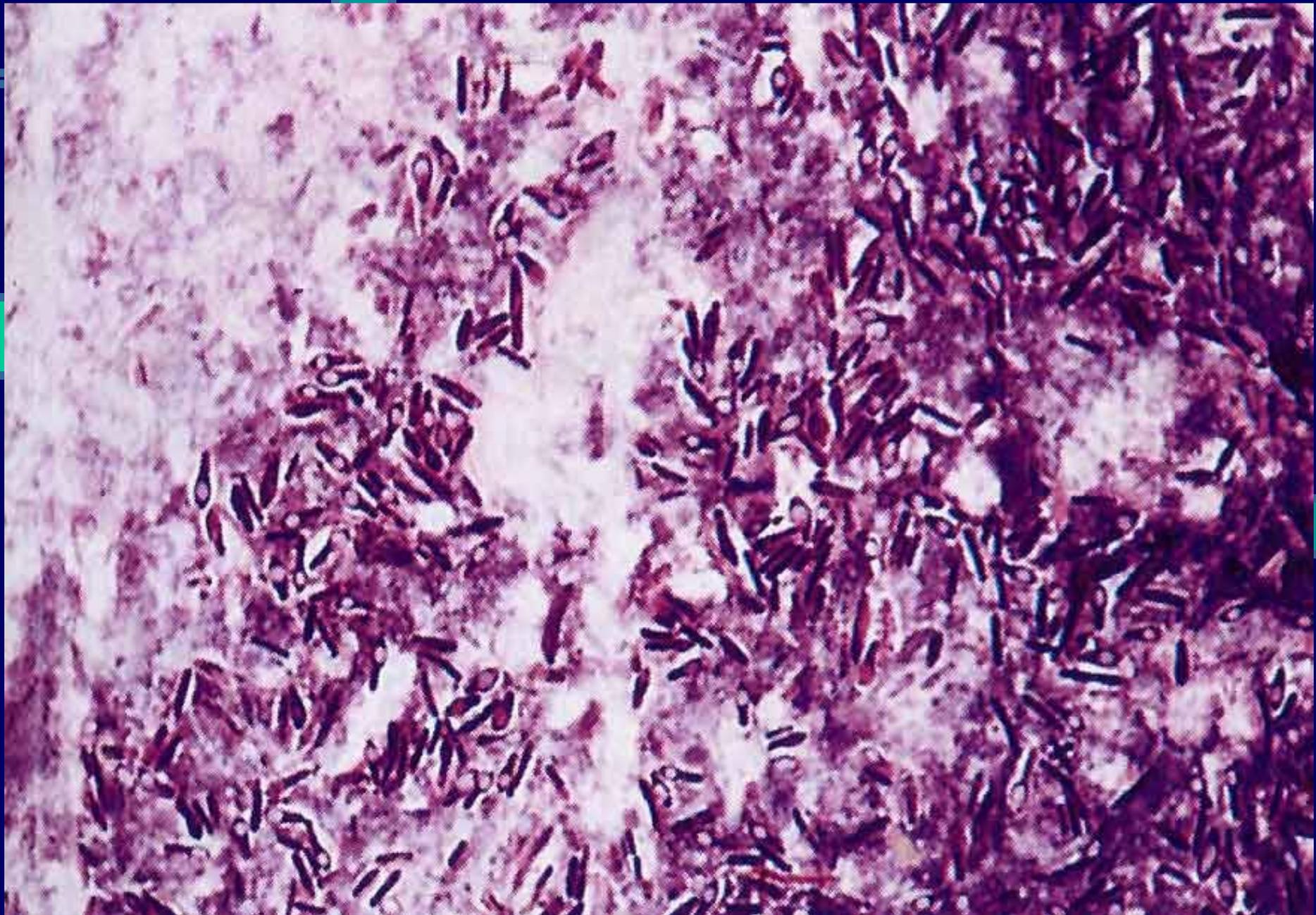
3. облигатные анаэробы – бактерии, которые получают энергию при окислении органических или неорганических веществ без доступа свободного O_2 воздуха или анаэробным фотосинтезом

(квотриджи, столбика, ботулизм)





Clostridii:
- botulinum;
- perfringens;



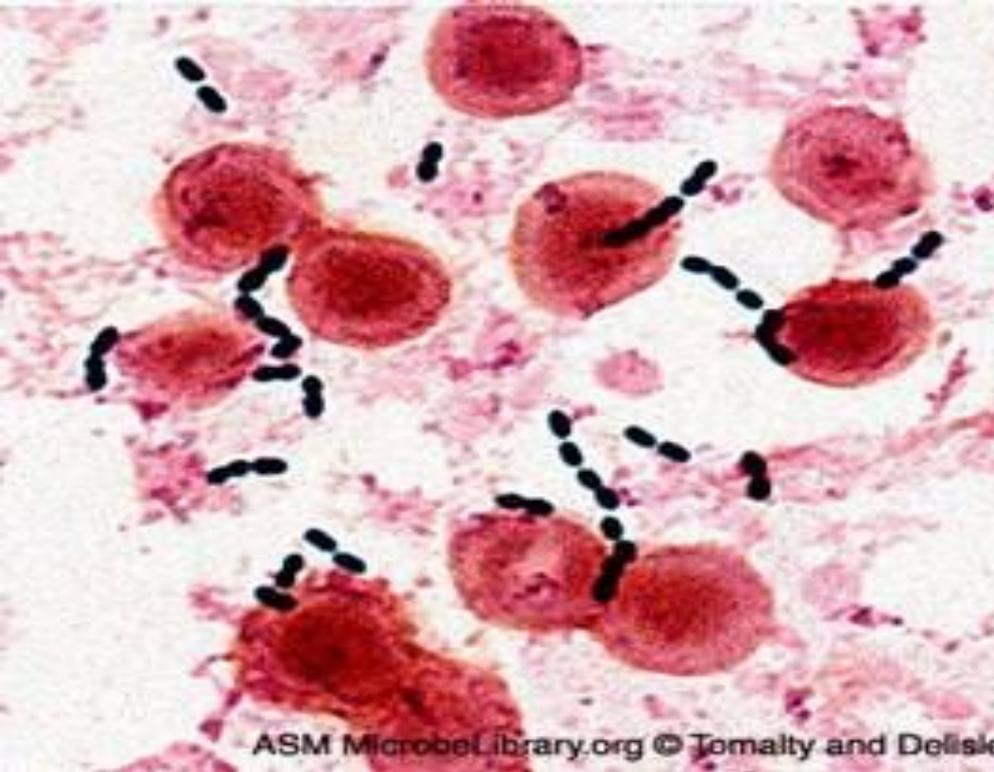


Облигатные анаэробы способные размножаться в среде с остаточным содержанием O^2 относят к «АЭРОТОЛЕРАНТНЫМ»



4. Факультативные анаэробы -

бактерии способные извлекать энергию из субстратов аэробным и анаэробным путями биологического окисления в зависимости от источника кислорода (большинство сапрофитных и патогенных микробов)

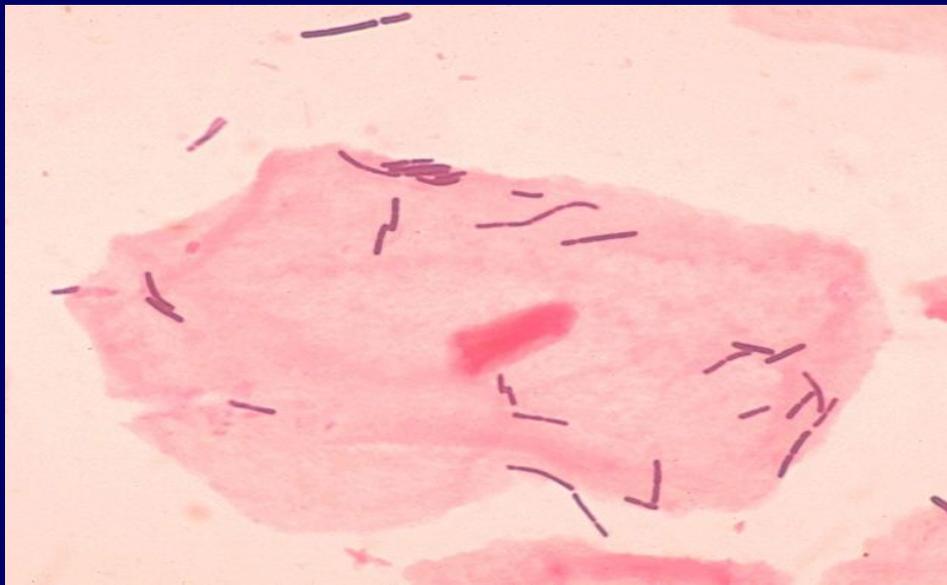


ASM MicrobelLibrary.org © Tomalty and Delisk

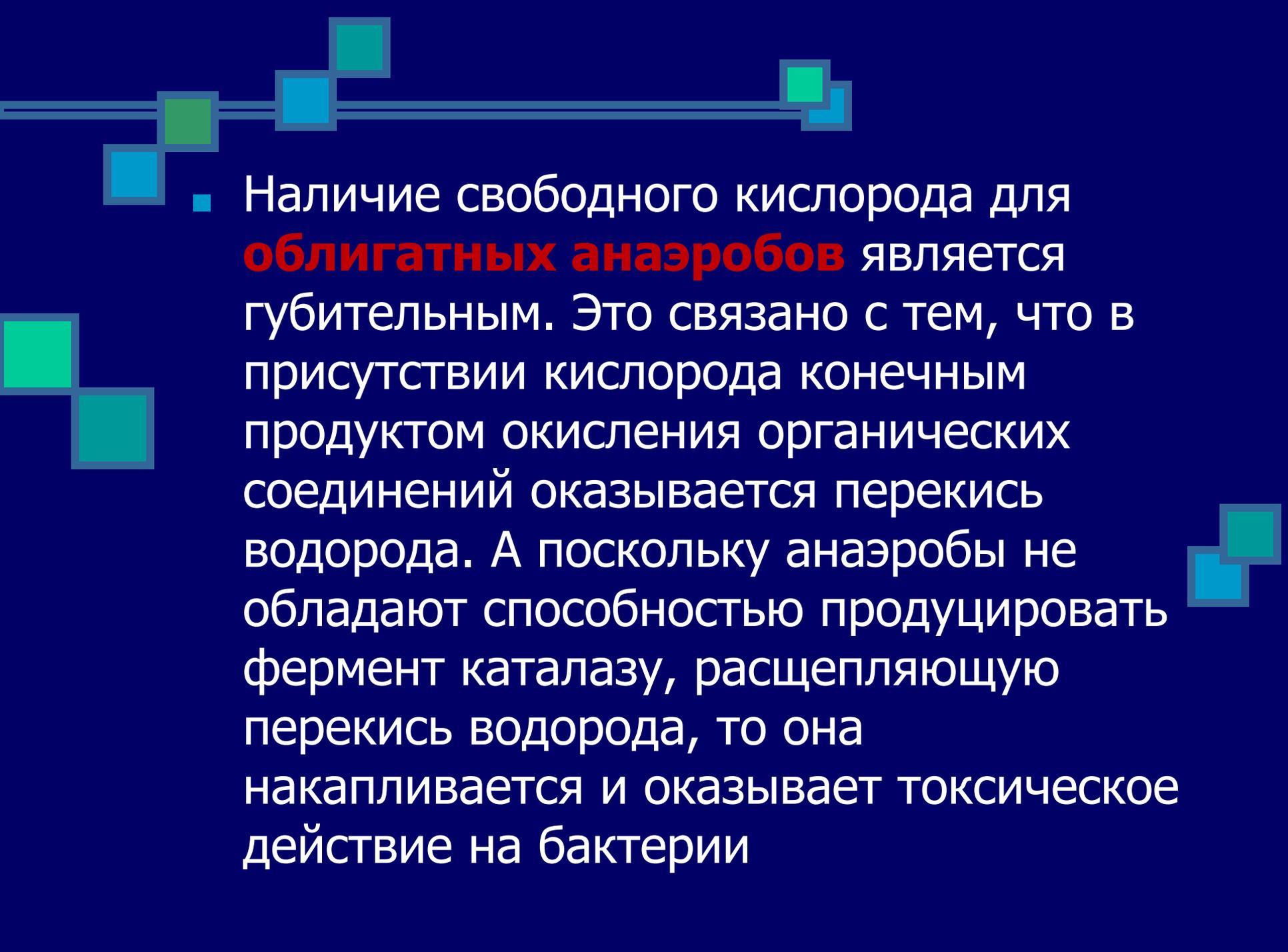
Род Streptococcus spp.



Род Morganella spp.



Род Lactobacillus spp.

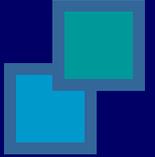
- 
- Наличие свободного кислорода для **облигатных анаэробов** является губительным. Это связано с тем, что в присутствии кислорода конечным продуктом окисления органических соединений оказывается перекись водорода. А поскольку анаэробы не обладают способностью продуцировать фермент каталазу, расщепляющую перекись водорода, то она накапливается и оказывает токсическое действие на бактерии



Облигатно анаэробные бактерии в природе могут находиться в аэробных зонах, что обеспечивается :

- широкое распространение представителей рода *Clostridium* в местах с высоким парциальным давлением O_2 объясняется наличием у них **эндоспор**, нечувствительных к молекулярному кислороду

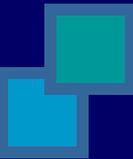
- **совместное развитие с облигатными аэробами**, активно потребляющими молекулярный кислород, приводящее к образованию зон с низкой концентрацией O_2 , создает возможности и для развития строго анаэробных видов

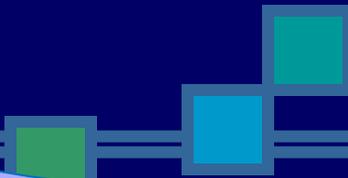


Аэробный тип дыхания в энергетическом отношении является наиболее эффективным

Примером может служить окисление 1 моль глюкозы:

- в аэробных условиях этот процесс сопровождается выделением **688,5 ккал**
- в анаэробных условиях образуется **31,2 ккал**

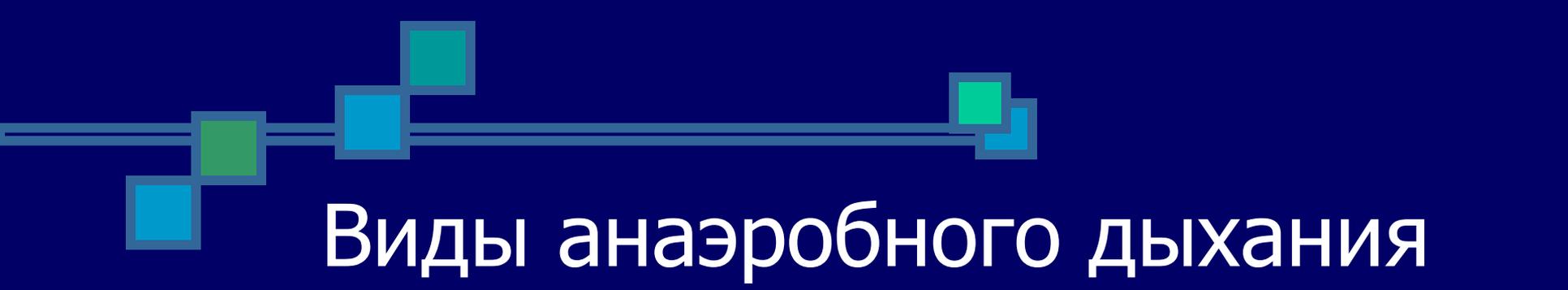




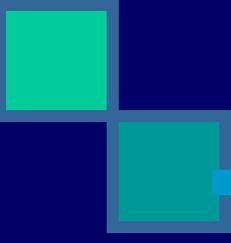
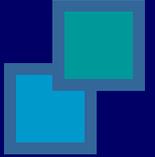
В процессе аэробного дыхания образуются токсические продукты окисления (H_2O_2 - перекись водорода, O_2 - свободные кислородные радикалы), от которых защищают специфические ферменты, прежде всего *каталаза*, *пероксидаза*, *пероксиддисмутаза*.

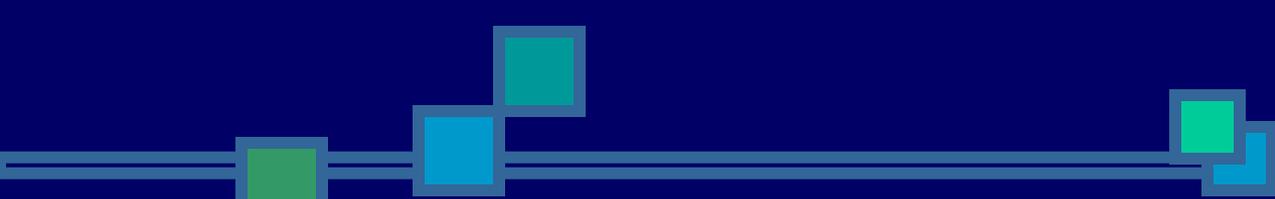


У анаэробов эти ферменты отсутствуют, также как и *система регуляции окислительно-восстановительного потенциала (rH_2)*

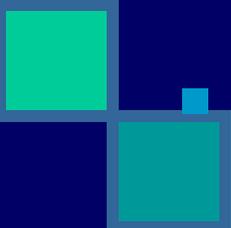


Виды анаэробного дыхания

- 
- 1. Нитратное (акцептор е НИТРАТЫ)
 - 2. Сульфатное (акцептор е СУЛЬФАТЫ)
 - 3. Серное (акцептор е СЕРА)
 - 4. «Железное» (акцептор е ЖЕЛЕЗО)
 - 5. Карбонатное (акцептор е УГЛЕКИСЛЫЙ ГАЗ)
 - 6. Фумаратное (акцептор е фумарат)
- 



■ Нитратное дыхание осуществляется 2 путями:



- АММОНИФИКАЦИЯ НИТРАТА с образованием аммиака

- ДЕНИТРИФИКАЦИЯ НИТРАТА с образованием молекулярного азота



Нитратное дыхание характерно для факультативных анаэробов

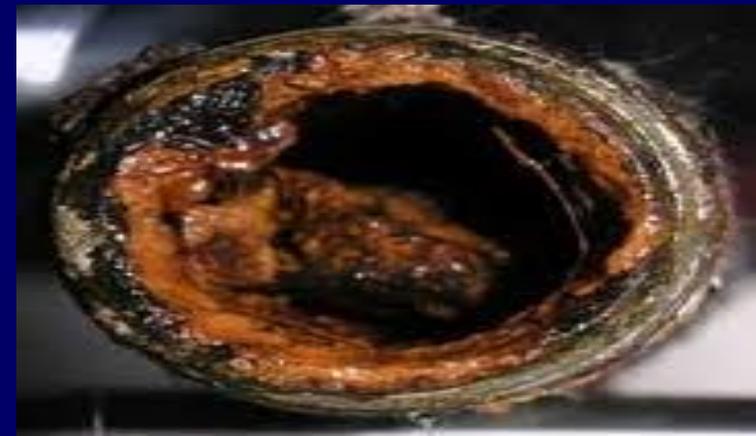


Сульфатное дыхание

- Хемоорганогетеротрофы в качестве доноров водорода используют органические кислоты и спирты
- Хемолитотрофы в качестве донора водорода используют молекулярный водород
- Конечным продуктом окисления является уксусная кислота
- Встречается у облигатных анаэробов: археи, сульфатредуцирующие бактерии

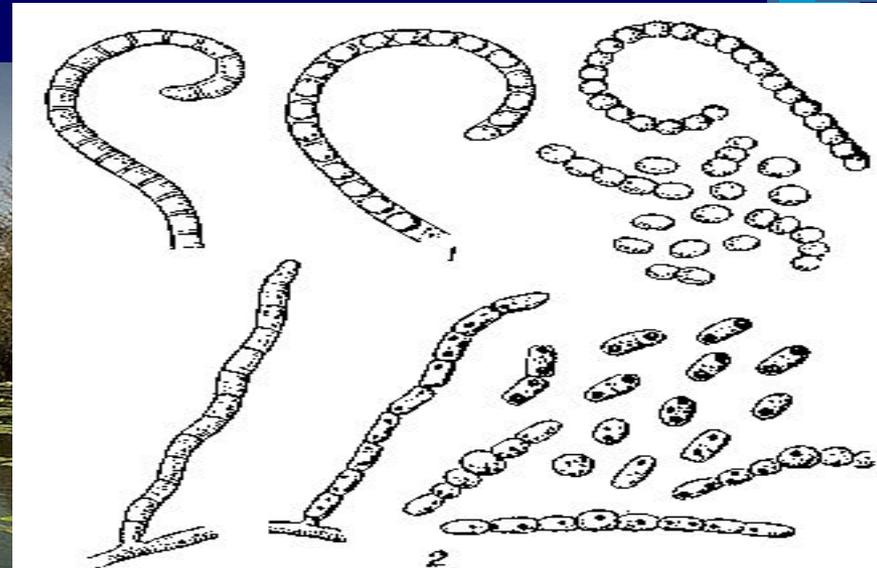
«Железное» дыхание

- Возникло раньше сульфатного, нитратного и аэробного типов дыхания
- Участвуют комплексообразователи - сидерофоры
- Происходит восстановление трехвалентного железа в двухвалентное
- Синтезируется около 11 молекул АТФ



Карбонатное дыхание

- Конечным акцептором электронов служит углекислота или CO_2 ;
Встречается у метанообразующих бактерий (метаногены), обитающих в болотах, в илах, отстойниках очистных сооружений



Серное дыхание

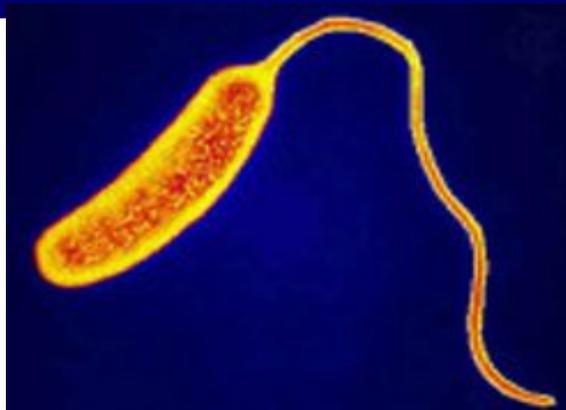
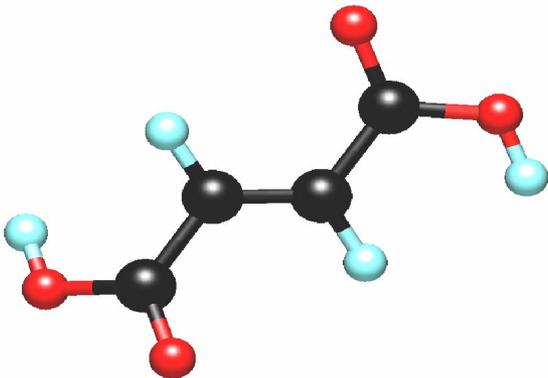
- Встречается у серных бактерий, обитающих в местах связанных с вулканической деятельностью, где много абиогенной элементарной серы



Фумаратное дыхание

Конечным акцептором электронов является фумарат - промежуточный продукт распада АЦЕТИЛ-КОА в цикле трикарбоновых кислот

К фумаратному дыханию способны энтеробактерии, вибрионы, пептострептококки



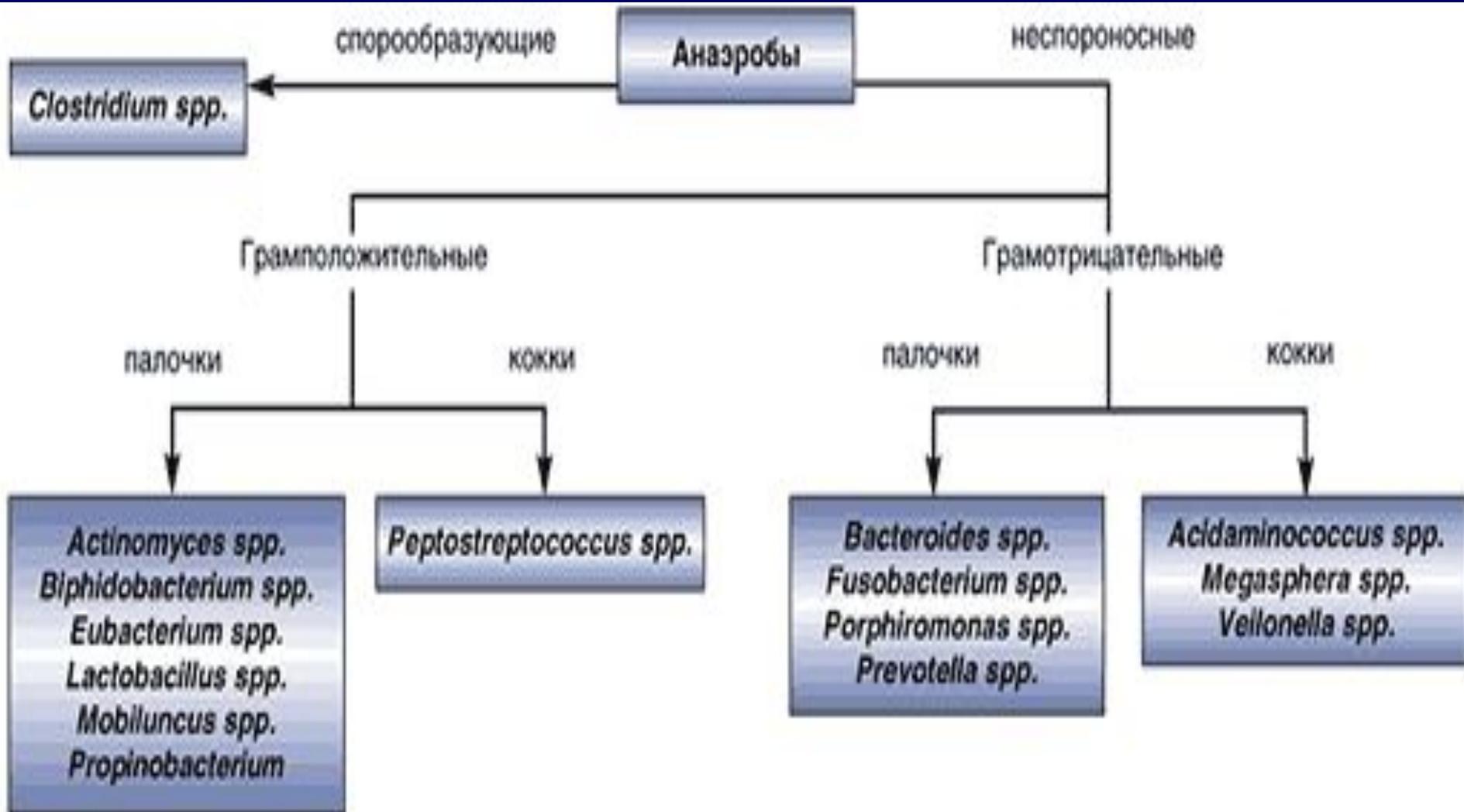
Большинство прокариот способны осуществлять брожение

БРОЖЕНИЕ - совокупность энергетических процессов при которых органические соединения служат и донорами и акцепторами электронов. Кислород в брожении не участвует. Микроорганизмы, вызывающие брожение относятся к облигатным или факультативным анаэробам

Особенности брожения у прокариот:

- Бактерии не способны поглощать полимерные молекулы органических веществ, поэтому макромолекулы сначала расщепляются вне клетки экзоферментами на мономеры, а затем поглощаются и расходуются;
- Субстратом при брожении чаще всего являются углеводы (глюкоза)
- Конечным продуктом брожения является не только пировиноградная кислота, но и другие соединения - этиловый спирт, уксусная, молочная, масляная кислоты и др.
- При расщеплении 1 моля глюкозы образуется от 1 до 4 молей молекулы АТФ

Выделение чистых культур облигатных анаэробов.

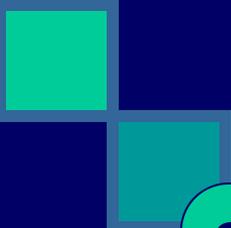


Правила проведения посева на питательные среды для получения чистых культур анаэробных бактерий

- Анаэробные бактерии можно культивировать только на специальных бескислородных питательных средах с низким окислительно-восстановительным потенциалом (ОВП).
- Для контроля за насыщением этих сред кислородом используют специальные редокс-индикаторы.
- Для сохранения низкого ОВП среды должны быть агаризованы.
- Для культивирования облигатно-анаэробных бактерий среды должны быть свежеприготовленными (не позднее 2 часов).
- Для успешного выращивания требуется внесение большого количества посевного материала. Это связано с тем, что в больших количествах анаэроб способны быстрее понижать ОВП среды.
- Среда должны очень богаты питательными субстратами и витаминами, факторами роста, т.к. анаэробный тип дыхания менее продуктивный, чем аэробный.



Основные методы создания анаэробных условий для культивирования микроорганизмов



**ФИЗИЧЕСКИЕ
МЕТОДЫ**

**ХИМИЧЕСКИЕ
МЕТОДЫ**

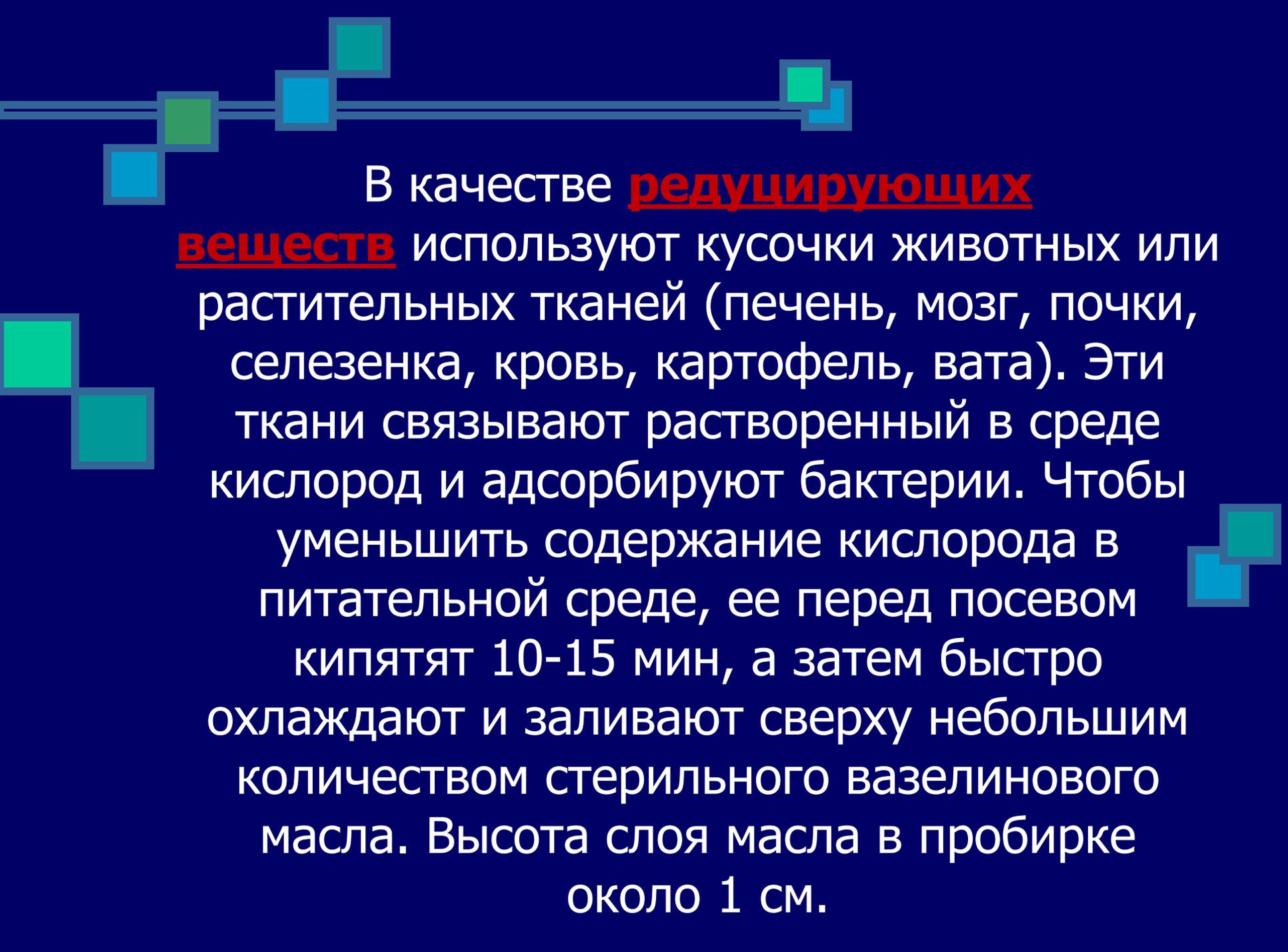
**БИОЛОГИЧЕСКИЕ
МЕТОДЫ**

**СМЕШАННЫЕ
МЕТОДЫ**



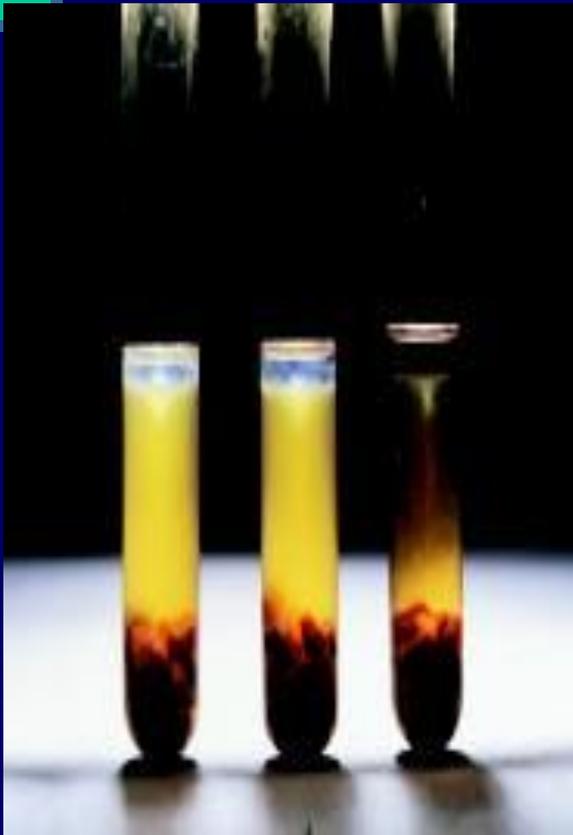
Физические методы

- посев в среды, содержащие редуцирующие и легко окисляемые вещества;
- посев в глубину плотных питательных сред;
- механическое удаление воздуха из сосудов, в которых выращиваются анаэробные микроорганизмы;
- замена воздуха в сосудах каким-либо индифферентным газом



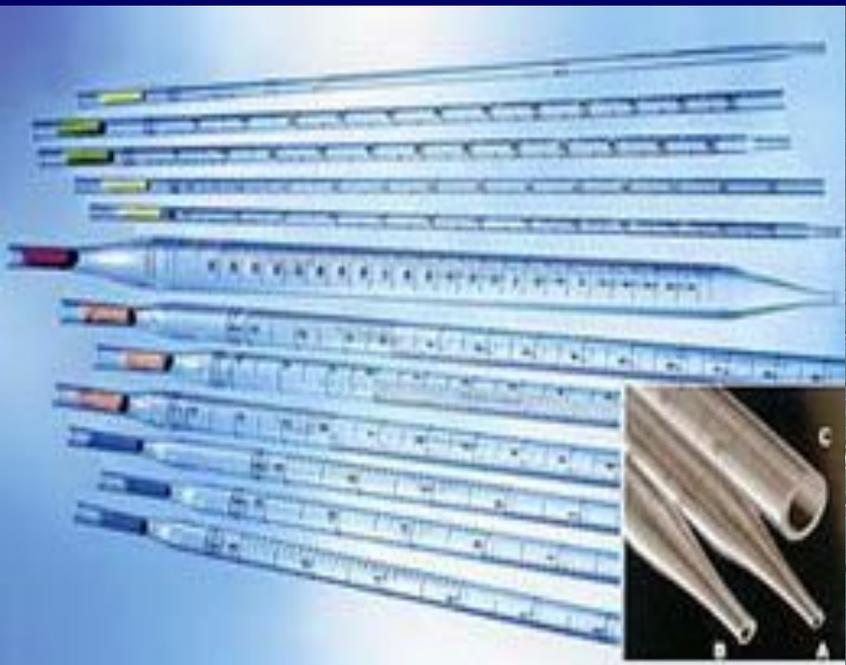
В качестве редуцирующих веществ используют кусочки животных или растительных тканей (печень, мозг, почки, селезенка, кровь, картофель, вата). Эти ткани связывают растворенный в среде кислород и адсорбируют бактерии. Чтобы уменьшить содержание кислорода в питательной среде, ее перед посевом кипятят 10-15 мин, а затем быстро охлаждают и заливают сверху небольшим количеством стерильного вазелинового масла. Высота слоя масла в пробирке около 1 см.

В качестве легко окисляемых
веществ используют глюкозу, лактозу
и муравьинокислый натрий



Лучшей жидкой питательной средой с редуцирующими веществами является среда Китта - Тароцци, которая используется с успехом для накопления анаэробов при первичном посеве из исследуемого материала и для поддержания роста выделенной чистой культуры анаэробов

Посев микроорганизмов в глубину
плотных сред производят по способу Вейон-
Виньяль, который состоит в механической
защите посевов анаэробов от кислорода
воздуха.



Описание метода Вейон-Виньяль

Берут стеклянную трубку длиной 30 см и диаметром 3-6 мм.

Один конец трубки вытягивают в капилляр в виде пастеровской пипетки, а у другого конца делают перетяжку. В оставшийся широкий конец трубки вставляют ватную пробку.

В пробирки с расплавленным и охлажденным до 50°C питательным агаром засевают исследуемый материал. Затем насасывают засеянный агар в стерильные трубки Вейон-Виньяль. Капиллярный конец трубки запаивают в пламени горелки и трубки помещают в термостат. Так создаются благоприятные условия для роста самых строгих анаэробов.

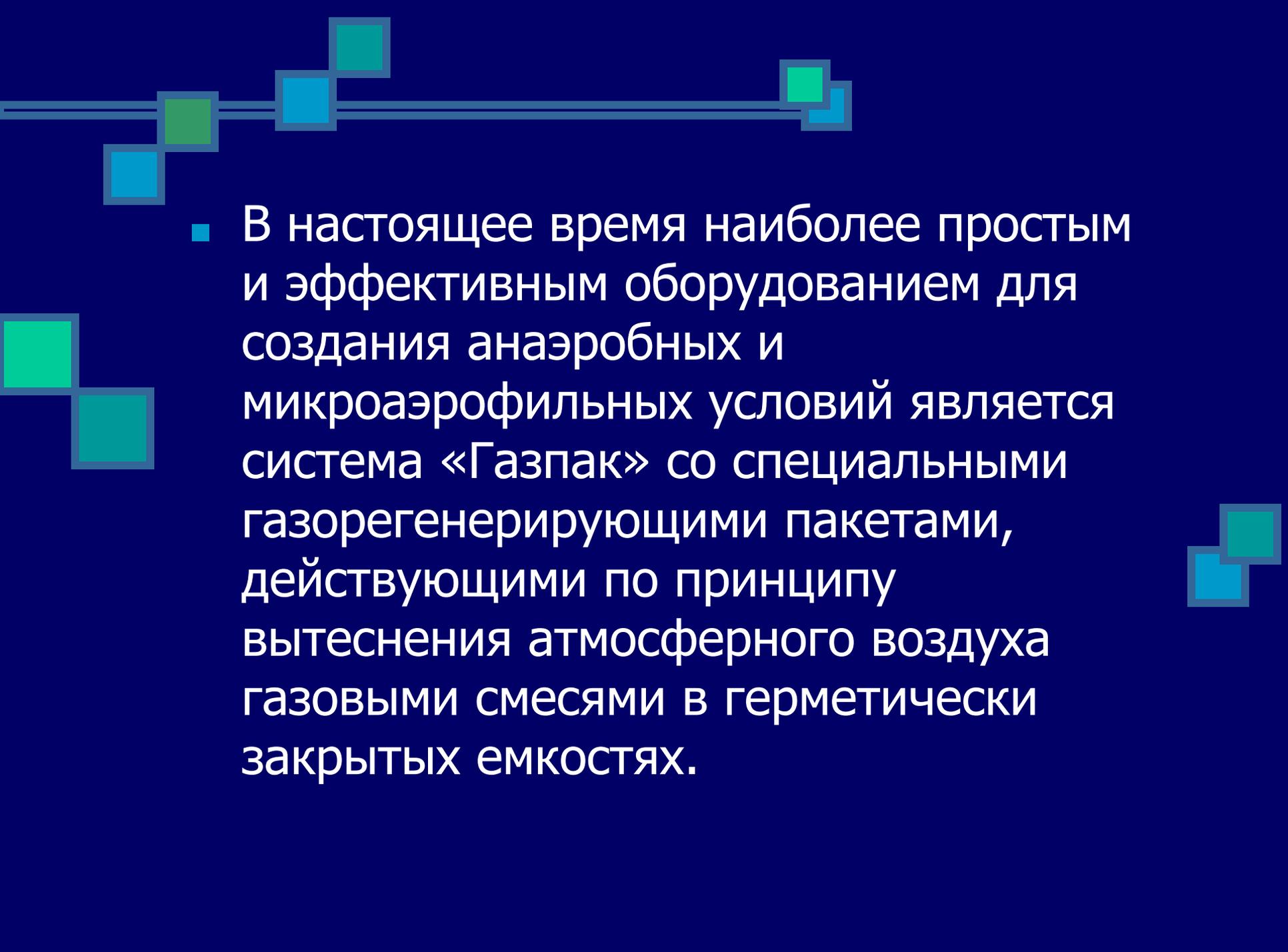
Для выделения отдельной колонии трубку надрезают напильником, соблюдая правила асептики, на уровне колонии, ломают, а колонию захватывают стерильной петлей и переносят в пробирку с питательной средой для дальнейшего выращивания и изучения в чистом виде

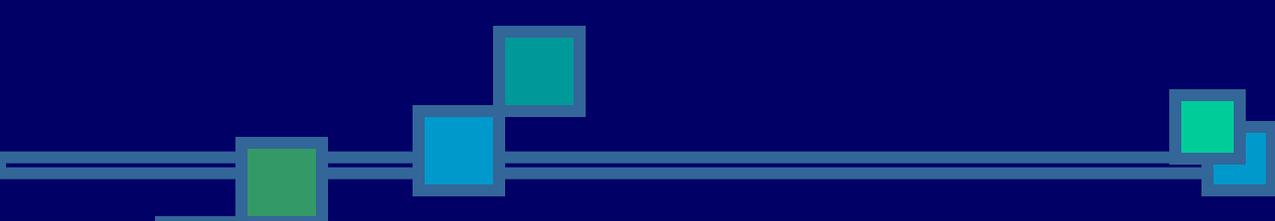


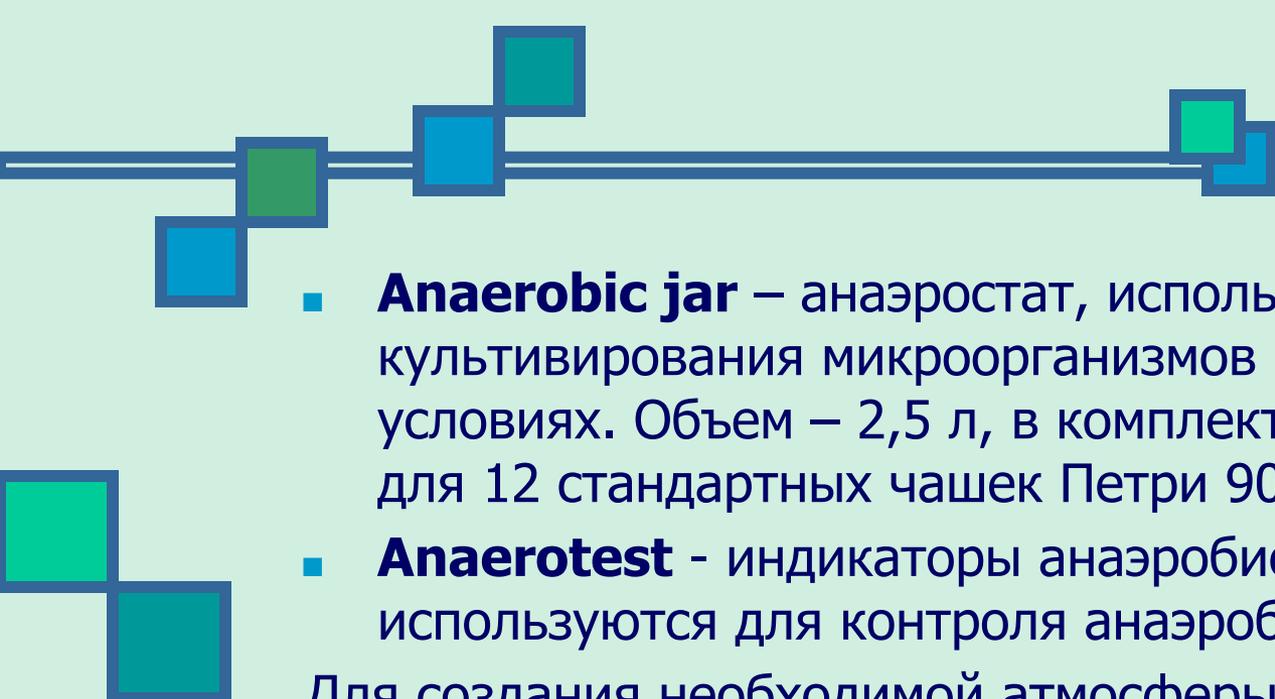
К физическим методам создания анаэробных условий относится **культивирование в анаэростате**

- вакуумном аппарате для выращивания микроорганизмов, в котором воздух удален или замещен газовой смесью.

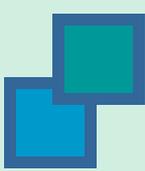
Наиболее часто используемая смесь имеет следующий состав:
азот с 5% CO₂ и 10% H₂

- 
- В настоящее время наиболее простым и эффективным оборудованием для создания анаэробных и микроаэрофильных условий является система «Газпак» со специальными газорегенерирующими пакетами, действующими по принципу вытеснения атмосферного воздуха газовыми смесями в герметически закрытых емкостях.



- 
- **Anaerobic jar** – анаэроостат, используется для культивирования микроорганизмов в анаэробных условиях. Объем – 2,5 л, в комплект входит штатив для 12 стандартных чашек Петри 90 мм.
 - **Anaerotest** - индикаторы анаэробнобиоза (анаэротесты), используются для контроля анаэробных условий.

Для создания необходимой атмосферы в анаэроостате используют газогенерирующие пакеты Anaerocult. Пакеты активируются простым добавлением воды, после чего происходит химическое связывание кислорода. В результате концентрация кислорода в анаэроостате снижается, а концентрация углекислого газа возрастает. Anaerocult-пакеты безопасны в работе, просты в использовании и надежны



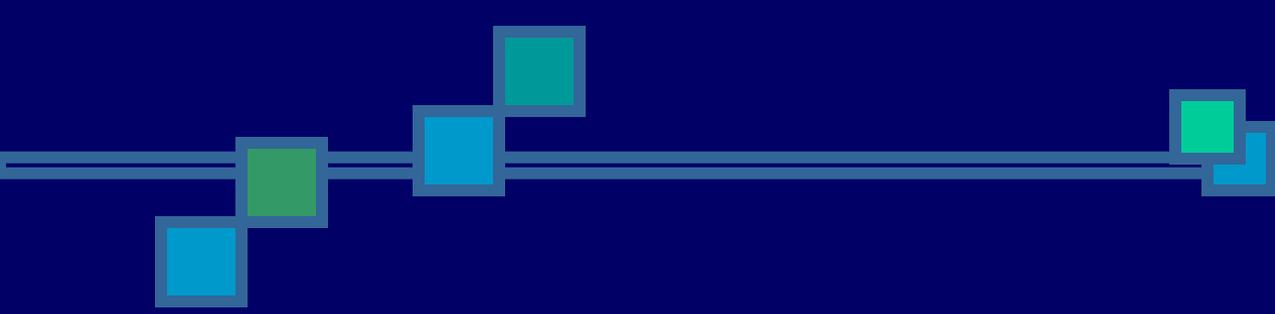
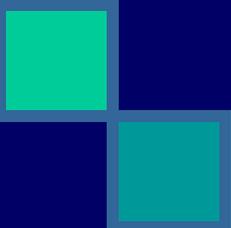
■ Типы газпаков:

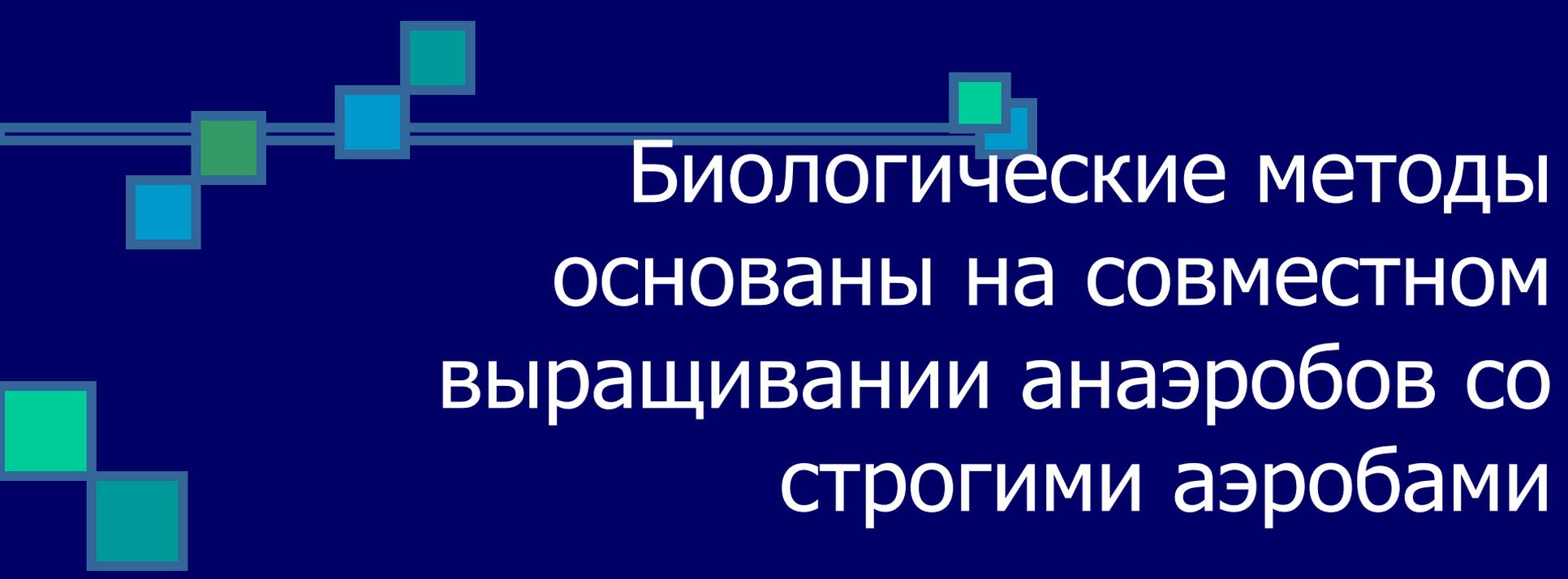
- **Anaerocult-A** – создает анаэробные условия для культивирования Clostridium, Bacteroides, Fusobacterium, Peptococcus, Peptostreptococcus.
- **Anaerocult-C** – создает специальные микроаэрофильные условия с концентрацией CO₂ – 8-10% и O₂ – 5-6%. Такая атмосфера необходима для культивирования Neisseria, Campylobacter, Haemophilus, Legionella, Lactobacillus, Bifidobacterium.
- **Anaerocult-A mini** – создает анаэробные условия, анаэростат не требуется! В комплект входит изолирующий пластиковый пакет, в который может поместиться 1-4 чашек Петри.
- **Anaerocult-C mini** – создает микроаэрофильные условия, анаэростат не требуется! В комплект входит изолирующий пластиковый пакет, в который может поместиться 1-4 чашек Петри



Химические методы

- **использование химических веществ, поглощающих молекулярный кислород**
поглотителем молекулярного кислорода в лабораторной практике является щелочной раствор пиригаллола, дитионит натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), металлическое железо, хлорид одновалентной меди и некоторые другие реактивы
- 

- 
- **использование восстанавливающих агентов,** которые добавляют в большинство сред для снижения окислительно-восстановительного потенциала среды: тиогликолат натрия, цистеин, аскорбиновая кислота
- 
- 



Биологические методы основаны на совместном выращивании анаэробов со строгими аэробами

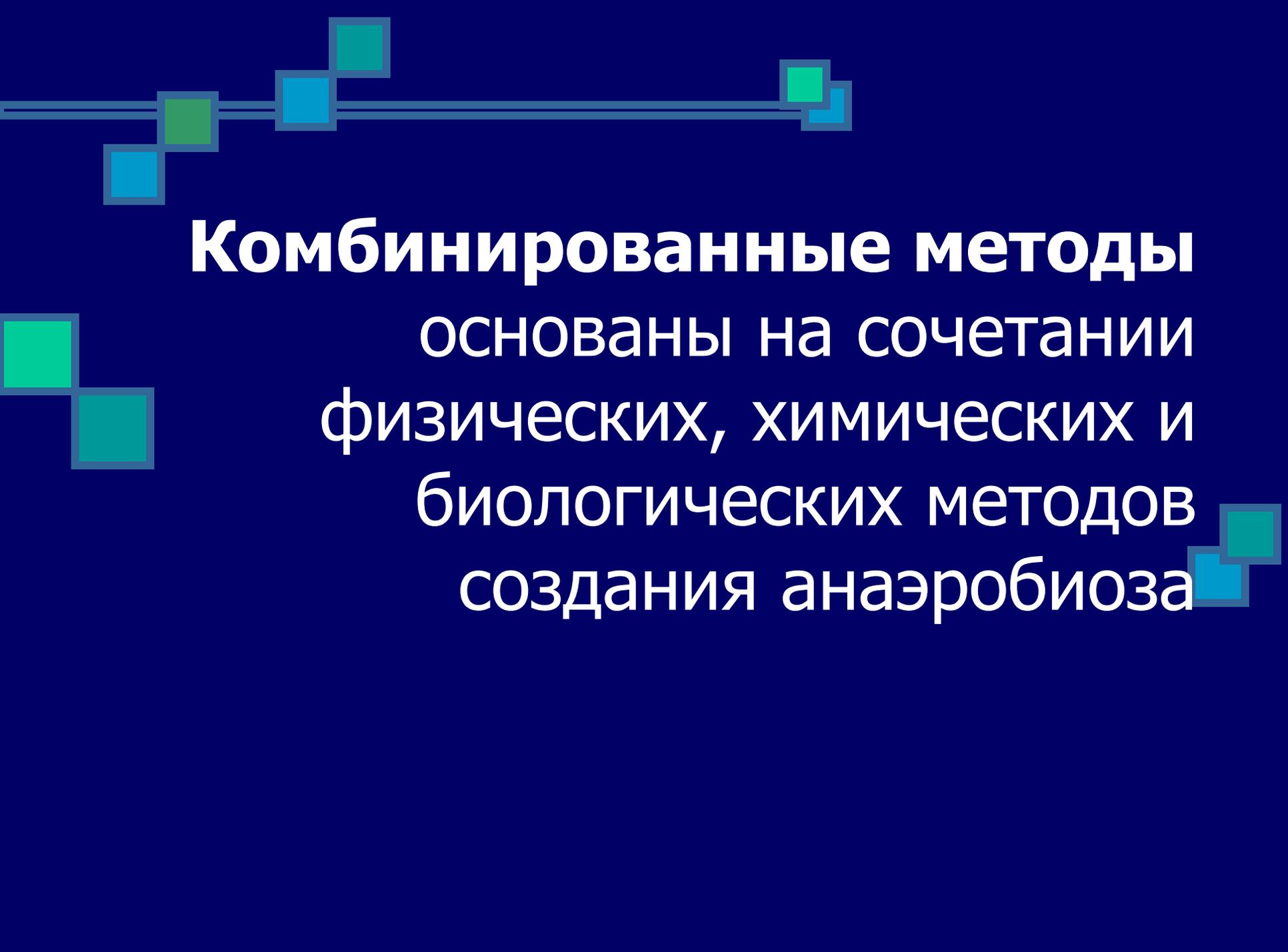
- Например, питательную среду в чашке Петри разделяют желобком на две половины, на одну половину засевают какой-либо аэробный микроорганизм, на другой - анаэроб. Края чашки заливают парафином. Рост анаэробного микроорганизма начнется только после полного использования кислорода аэробом.
- 



Совместное культивирование
аэробов и анаэробов

СОВМЕСТНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ АЭРОБОВ И АНАЭРОБОВ (МЕТОД ФОРТНЕРА)

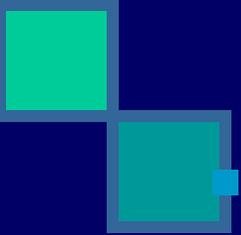
В чашке с сахарным агаром вырезается «траншея» («ров») для невозможности миграции, смешивания разных культур бактерий. С одной стороны выполняется посев культуры аэробных бактерий, с другой – умеренно строгих анаэробов. Чашка закрывается, ее края запаиваются парафином (с целью не допустить попадания воздуха, кислорода внутрь чашки). Сначала вырастают в присутствии кислорода аэробы, а затем – анаэробы.



Комбинированные методы
основаны на сочетании
физических, химических и
биологических методов
создания анаэробнобиоза

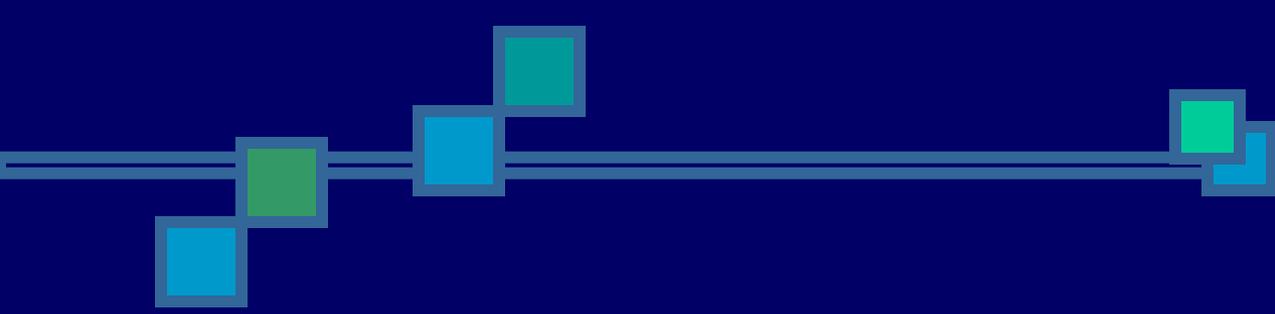
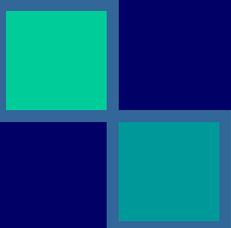


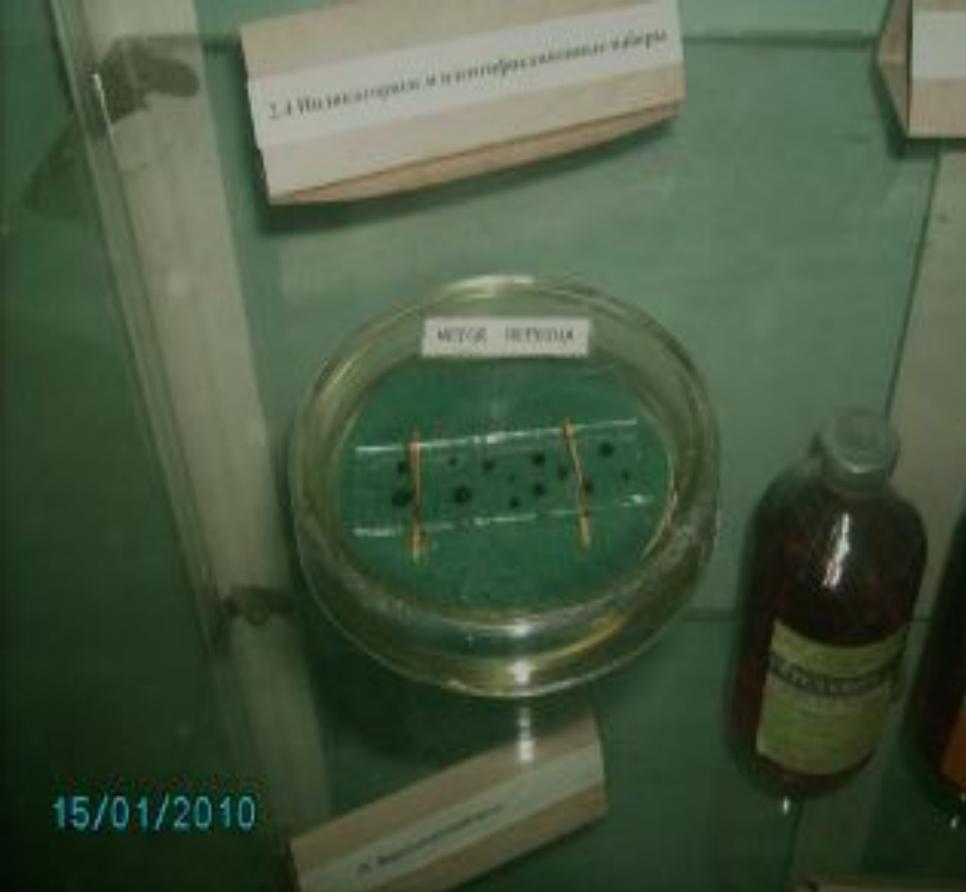
Методы выделения чистых культур анаэробов



Метод Цейсслера. Исследуемый материал сеют штрихами по поверхности плотной среды. Создают анаэробные условия. И инкубируют при 37° 24-72ч. Изолированные колонии анаэробов пересевают на среду контроля стерильности или среду Китта-Тароцци.



- 
- **Метод Вейнберга.** Несколько капель исследуемого материал вносят в пробирку с 4-5мл изотонического раствора. Перемешивают запаянным капилляром переносят в пробирку с охлажденным до 45-50 градусов сахарным агаром, разлитым высоким столбиком. После перемешивания этим же капилляром засевают еще две пробирки с сахарным агаром и быстро охлаждают под струей воды. Выросшие в глубине колонии пересевают на СКС или среду Китта-Тароцци.
- 
- 



Метод Перетца. Готовят разведение материала, как указано выше. Содержимое пробирки с соответствующим разведением выливают в чашку Петри, на дне которой на двух палочках лежит стеклянная пластина 6х6см. среду заливают так, что бы она заполнила пространство между пластиной и дном чашки. При появлении роста пластинку поднимают и чистые колонии пересеваяют

Схема выделения чистой культуры облигатных анаэробов.



- Взятие исследуемого материала осуществляется шприцем с притертым поршнем, после чего материал вносят в пробирку с транспортной средой.
- Выделение чистой культуры проводится со строгим соблюдением анаэробных условий на всех этапах исследования.

1-й этап – получение изолированных колоний.

Готовят ряд разведений исследуемого материала и делают посев на чашки Петри со средой КАБ или другой питательной средой для культивирования анаэробов. Посевы инкубируют в микроанаэроостатах, заполненных газовой смесью, при температуре 37С в течение 48-72 часов.



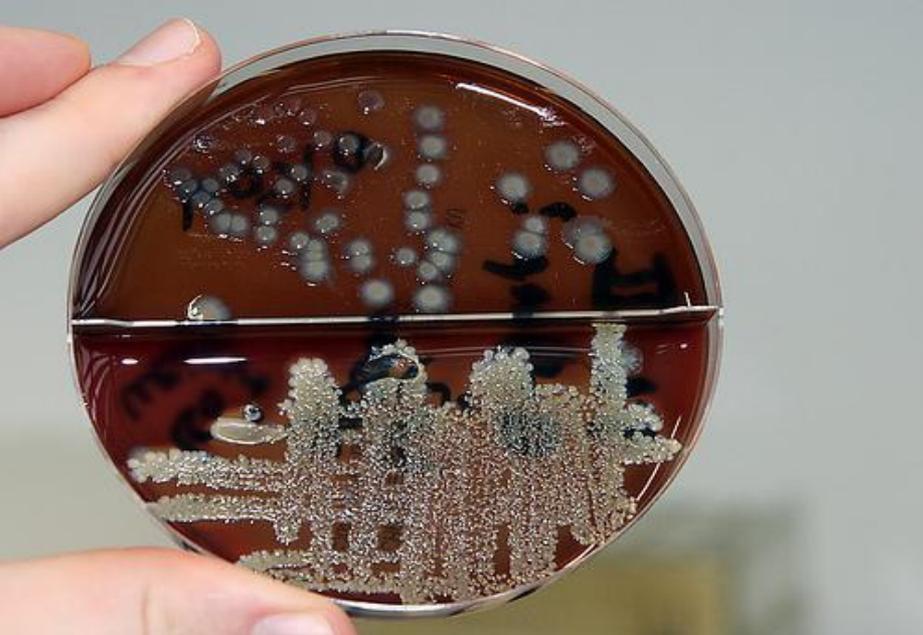


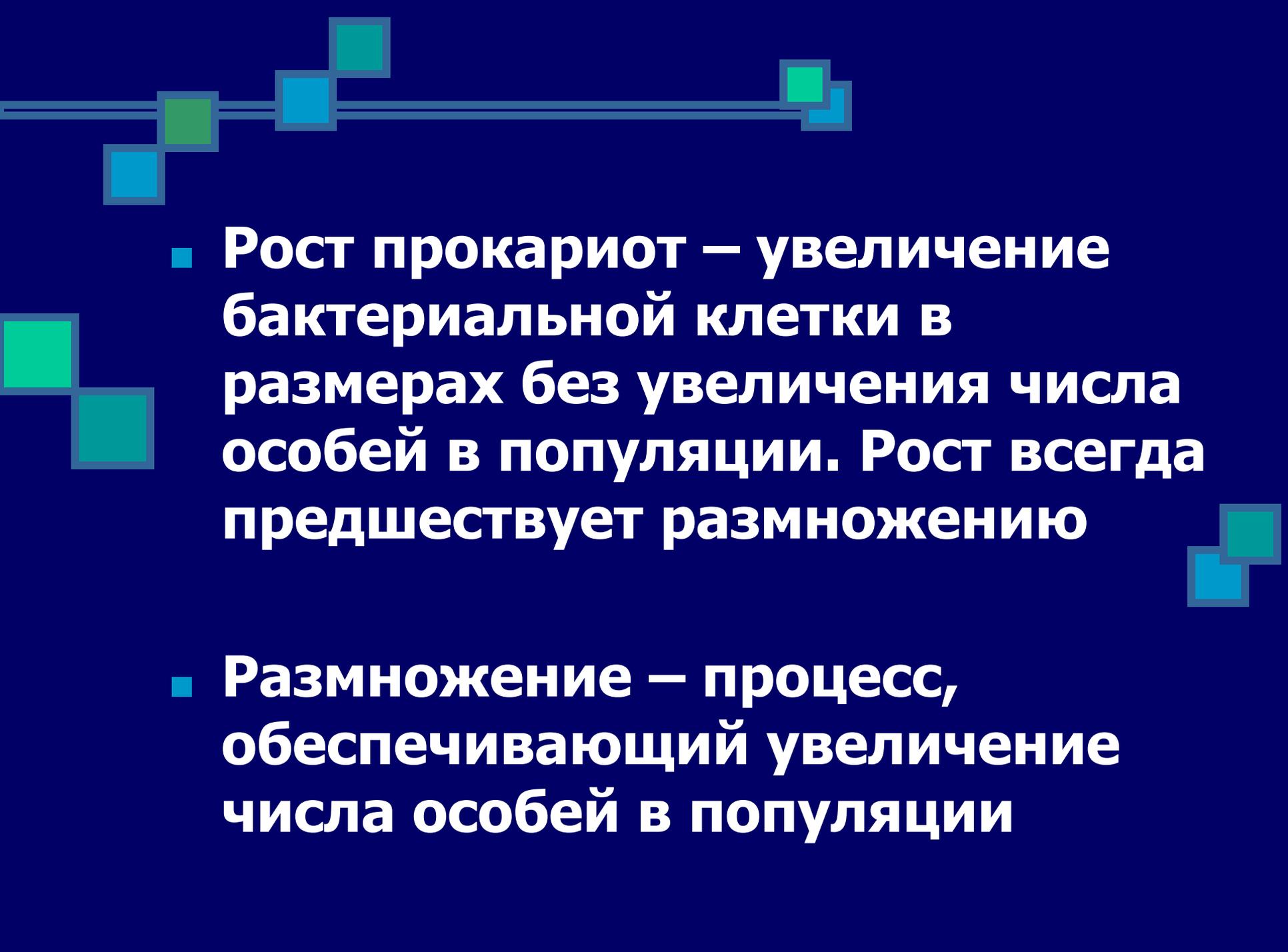
Схема выделения чистой культуры облигатных анаэробов.

- *2-й этап - получение чистой культуры анаэробов.*
- На этом этапе:
 - 1. Изучают морфологические и культуральные свойства выросших колоний.
 - 2. Проводят параллельный рассев каждой отобранной колонии на две чашки Петри с питательной средой, например КАБ. Одну чашку инкубируют в аэробных условиях, другую - в анаэробных условиях.
- Для дальнейшего исследования отбирают культуры, выросшие только в анаэробных условиях (так исключают факультативные анаэробы).

Схема выделения чистой культуры облигатных анаэробов.

- *3-й этап - идентификация выделенных облигатных анаэробов.*
- Проводят биохимическую идентификацию в микротест-системе, например AP1-20А. Суспензию выделенной культуры засевают на пластину AP-20А с набором биохимических гестов, инкубируют в анаэробных условиях в течение 48 часов, учитывают биохимические свойства культуры по изменению окраски индикаторов системы и определяют ее родовую и/или видовую принадлежность.



- 
- **Рост прокариот – увеличение бактериальной клетки в размерах без увеличения числа особей в популяции. Рост всегда предшествует размножению**
 - **Размножение – процесс, обеспечивающий увеличение числа особей в популяции**

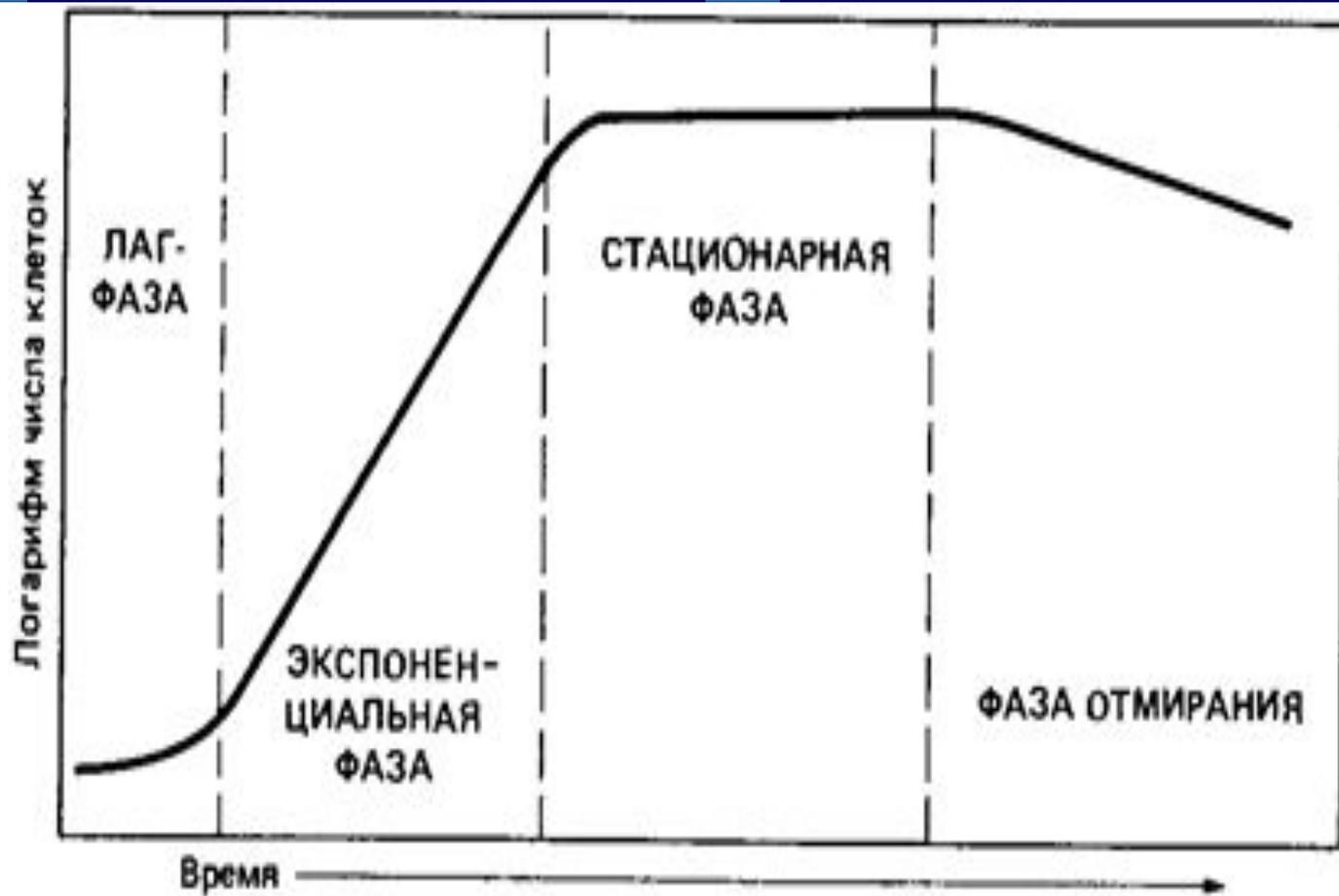
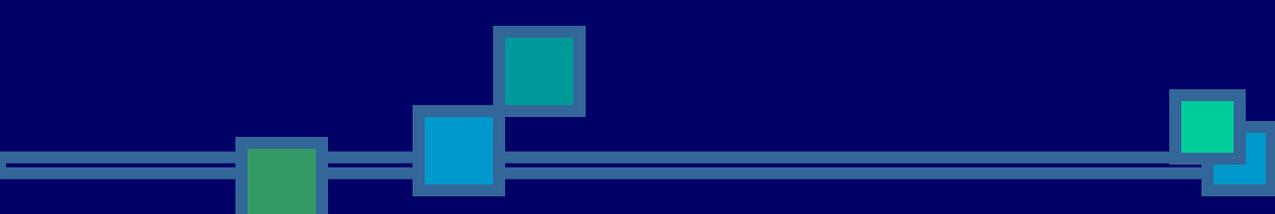


Рис. 6.6. Кривая роста бактериальной культуры.

- ЛАГ-фаза (фаза покоя) – продолжительность 3-4 часа, происходит адаптация бактерий к питательной среде, начинается активный рост клеток, но деления еще не происходит, в клетках увеличивается содержание белка и РНК.
- ЛОГ-фаза – активно идут процессы размножения клеток в популяции, размножение преобладает над гибелью.
- СТАЦИОНАРНАЯ фаза- популяция достигает МАХ концентрации, количество погибших особей равно количеству образующихся, дальнейшего увеличения числа особей не происходит.
- фаза ГИБЕЛИ – процессы гибели преобладают над процессом размножения, так как истощаются питательные субстраты в среде, накапливаются токсические продукты обмена веществ.



Время генерации (время удвоения)

для разных видов прокариот в благоприятных условиях



Escherichia coli



&

20 мин

Staphylococcus aureus

Borrelia hermsii

8ч



Mycobacterium tuberculosis **14-16 ч**

Treponema pallidum **33 ч**

Mycobacterium leprae **21 день**