

**Энергодающие
процессы
микробной
клетки**

Цель: познакомится с основными энергодающими процессами микроорганизмов, особенностями роста и методами их оценки.

План:

1. Особенности дыхания микроорганизмов.
2. Ферменты бактерий.
3. Рост и размножение бактерий.
4. Оценка роста бактерий.

Всем живым организмам для осуществления основных процессов жизнедеятельности необходима энергия.

Как прокариоты, так и эукариоты получают энергию, необходимую для существования, в виде АТФ.

Образование АТФ – универсального аккумулятора химической энергии происходит при дыхании или биологическом окислении.

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

Процесс дыхания включает в себя реакции биологического окисления и восстановления.

- **Окисление** – это отдача донорами (молекулами или атомами) водорода или электронов;
- **Восстановление** – присоединение водорода или электронов к акцептору

Если акцептором является молекулярный O_2 , такое дыхание считается аэробным; если это неорганическое соединение (нитраты, нитриты, сульфаты, сера, карбонаты, трехвалентное Fe) или органическое – фумарат, дыхание является анаэробным. При действии в качестве акцепторов электронов органических соединений происходит брожение.

В соответствии с потребностями в O_2 все бактерии разделяются на следующие группы:

1. Облигатные (строгие) аэробы.
2. Облигатные (строгие) анаэробы
3. Факультативные анаэробы
4. Микроаэрофильные бактерии
5. Аэротолерантные бактерии

Облигатные (строгие) аэробы -
микроорганизмы, которые. в качестве
конечного акцептора электронов и
протонов способны использовать
только свободный молекулярный
кислорода воздуха

Рост таких клеток прекращается при
любом ограничении поступления
кислорода

Облигатные (строгие) анаэробы – микроорганизмы, которым необходим не свободный, а связанный кислород. Они получают энергию при расщеплении кислородсодержащих веществ. Акцепторами электронов служат некоторые неорганические соединения, например сульфаты, нитраты. Такое дыхание называют соответственно анаэробным сульфатным или анаэробным нитратным.

Растут без доступа свободного кислорода, который для них токсичен. Представителями облигатных анаэробов являются возбудители ботулизма, газовой гангрены, столбняка.

Акцепторами электронов могут быть и органические вещества, образующиеся в результате брожения. При таком процессе происходит расщепление органических веществ с образование промежуточных продуктов, которые акцептируют электроны. Известны спиртовое, молочнокислое, маслянокислое и другие типы брожения.

Факультативные анаэробы - это микроорганизмы, которые способны получать энергию как аэробным, так и анаэробным путем, при этом в качестве терминального акцептора электронов и протонов могут использовать как молекулярный кислород, так и органические соединения. К этой группе микроорганизмов принадлежит большинство патогенных и условно-патогенных видов, например, представители семейства энтеробактерий, многие дрожжи и т. д.

Микроаэрофильные бактерии - это микроорганизмы, которые предпочитают развиваться при повышенной концентрации углекислого газа и низком содержании молекулярного кислорода. Такое соотношение создается, например, в области горения свечи. Поэтому их также называют «капнофильными микроорганизмами». К этой группе относятся некоторые возбудители болезней человека, например возбудитель кампилобактериоза, возбудитель хеликобактериоза.

Аэротолерантные бактерии это микроорганизмы , которые в течение короткого периода времени могут выживать в присутствии атмосферного свободного кислорода. Но размножаться они в этих условиях не могут.

Толерантность к O_2 обусловлена способностью бактерий ферментативным путем нейтрализовывать токсичные кислородные продукты (супероксид – радикал, гидроксил-радикал, ион пероксида), образуемые как побочные при аэробном дыхании.

Тип дыхания необходимо учитывать при проведении лабораторных исследований возбудителей заболеваний, при лечении некоторых инфекций (газовая гангрена). Этот признак позволяет создать необходимые оптимальные условия аэрации для культивирования микроорганизмов при производстве антибиотиков, ферментов и других препаратов.

В данном процессе используются ферменты:

- супероксид дисмутаза – переводит супероксид-радикал (наиболее токсичный метаболит) в H_2O_2 . Фермент имеется у аэробных и аэротолерантных микроорганизмов.
- каталаза – превращает H_2O_2 в H_2O и O_2 . Ей обладают все аэробные бактерии. Не имеют аэротолерантные микробные клетки.
- пероксидаза – катализирует окисление H_2O_2 в реакции с глутатионом органических соединений. При этом H_2O_2 превращается в H_2O .

Все внутриклеточные процессы утилизации питательных веществ бактериями в качестве источников энергии известны как *экзэргонические* реакции. Они протекают самопроизвольно.

Эндэргонические процессы приводят к синтезу различных компонентов клеток.

Бактерии утилизируют энергию, первично образуемую в процессах брожения или окисления, посредством дегидрирования. У бактериальных клеток (как и у эукариотических), энергия аккумулируемая в молекулах АТФ, выделяется в процессе ферментативных катаболических реакций.

Метаболические процессы

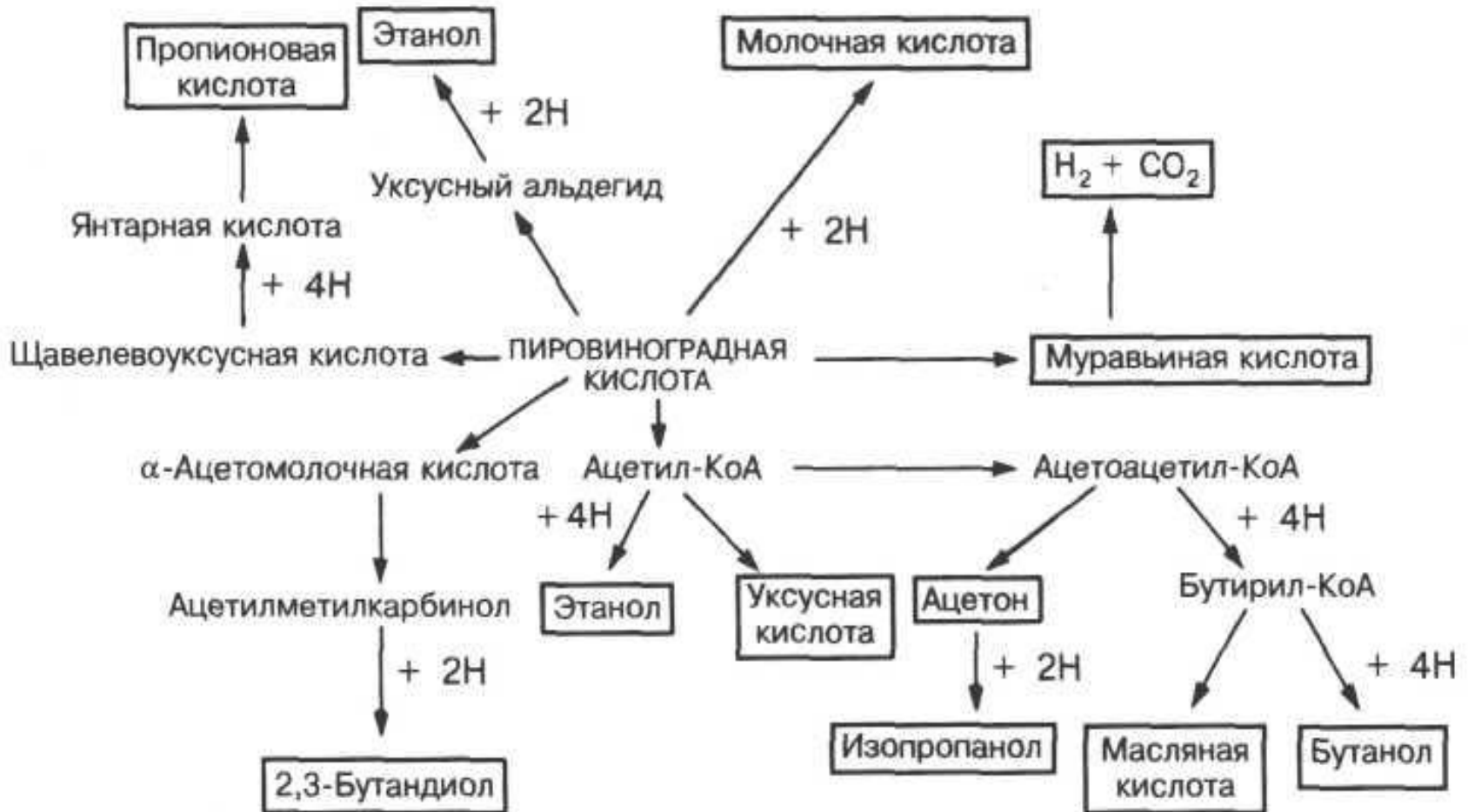
Экзэргонические –
процессы
утилизации
питательных
веществ
бактериями
в качестве источников
энергии

Эндэргонические -
процессы,
приводящие
к синтезу
различных компонентов
клеток

Бродильный метаболизм бактерий характеризуется образованием АТФ посредством фосфорилирования субстратов. Любое брожение проходит две стадии:

- **ОКИСЛЕНИЕ** – включает превращение глюкозы в пировиноградную кислоту;
- **ВОССТАНОВЛЕНИЕ** – использование атомов водорода для восстановления пировиноградной кислоты.

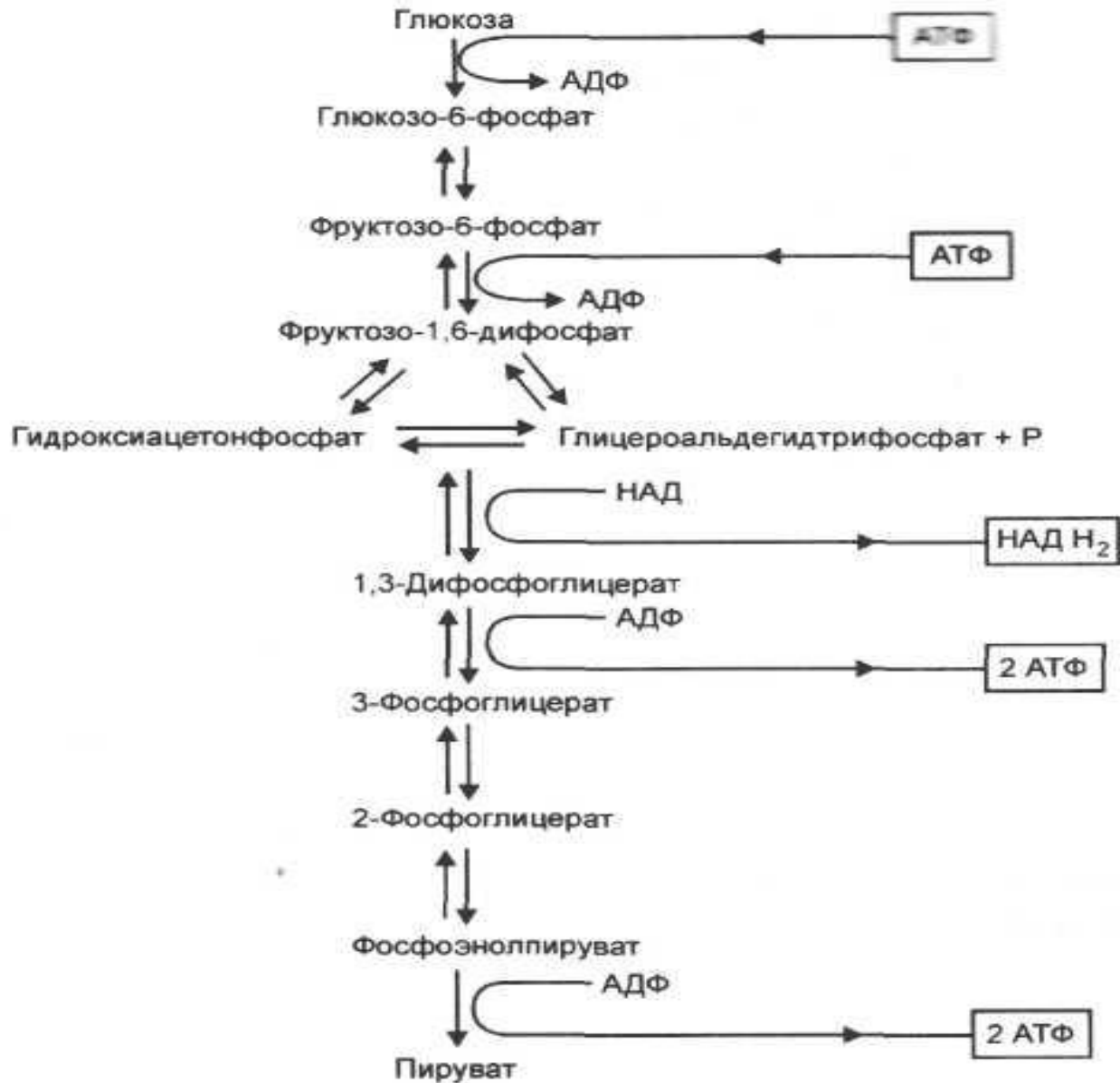
Пути восстановления пирувата в процессе брожения.



Процесс образования пирувиноградной кислоты включает серию реакций, общих для брожения и аэробного дыхания. У микроорганизмов выделяют три пути образования триоз из гексоз:

1. гликолитический,
2. пентозофосфатный путь,
3. путь Энтнера – Дудорова.

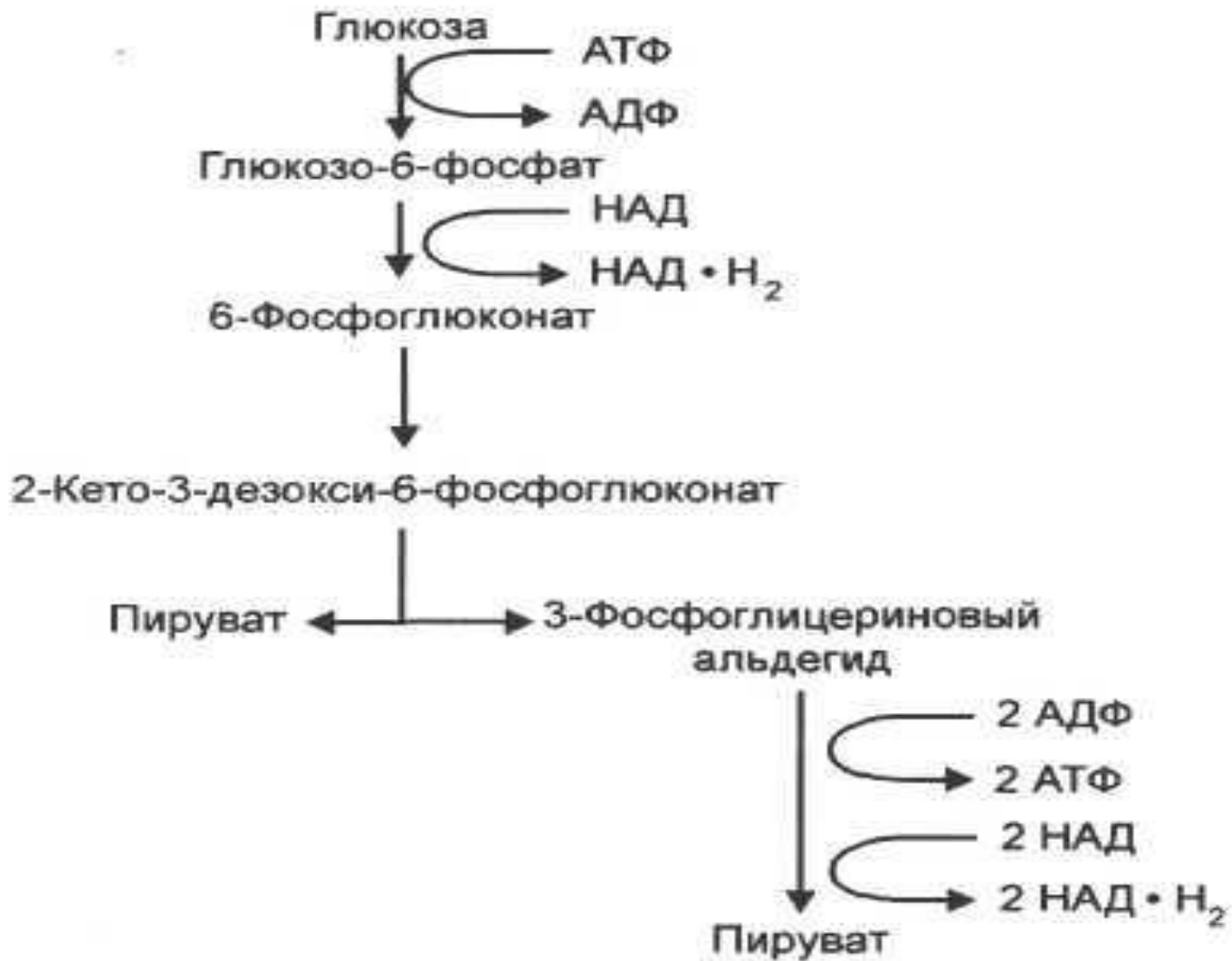
Гликолиз



Пентозофосфатный цикл



Путь Энтнера-Дудорова



При аэробном дыхании ПВК, полученная в процессе пути Энтнера-Дудорова и гликолитическим путём, окисляется в процессе цикла Кребса (цикла трикарбоновых кислот). Предварительно под воздействием ферментов бактериальной клетки пируват превращается в ацетил КоА.

Для нормальной жизнедеятельности микроорганизмам необходимо присутствие различных ферментных систем.

Ферменты – это вещества белковой природы, ускоряющие биохимические реакции. Существует несколько вариантов классификаций ферментов.

По действию и характеру превращений ферменты подразделяются на 6 групп:

1. Гидролазы
2. Оксидоредуктазы
3. Трансферазы
4. Изомеразы
5. Лигазы (синтетазы)
6. Лиазы

Гидролазы – ферменты, ускоряющие реакции гидролиза, наиболее широко распространены среди бактерий; расщепляют молекулы белковых, жировых и углеводных веществ в результате присоединения к ним молекул воды.

Оксидоредуктазы - ферменты
ускоряющие окислительно—
восстановительные процессы,
обуславливающие дыхание -
оксидаза, дегидрогеназа,
цитохромоксидаза, каталаза,
пероксидаза

Трансферазы - ферменты
переноса групп атомов и
радикалов между различными
соединениями —
аминотрансфераза,
фосфоротрансфераза

Изомеразы — ферменты,
превращающие органические
соединения в их изомеры -
фосфомутаза

Лигаза (синтетаза) —
ферменты, ускоряющие синтез
сложных соединений из более
простых -глутаминсинтетаза

Лиазы — ферменты,
отщепляющие от субстратов
химические группы
негидролитическим путем -
карбоксилазы и др

Классификация по месту действия:

- **Экзоферменты** - ферменты, выделяемые микробной клеткой во внешнюю среду для расщепления сложных молекул питательных веществ до более простых соединений. Их большинство.
- **Эндоферменты** - ферменты, которые работают внутри клеток.

Классификация по непрерывности действия:

- Конститутивные ферменты, которые синтезируются клеткой непрерывно.
- Индуцибельные (адаптивные) ферменты, которые бактериальная клетка продуцирует только в присутствии в окружающей среде субстрата данного фермента (E.Coli выделяет фермент β -галактозидаза только при наличии в среде лактозы).

Изучение специфической ферментативной активности микроорганизмов широко используется в лабораторной диагностике для их идентификации. Определяют ферментацию сахаров, спиртов и других субстратов, протеолитическую, гликолитическую, лецитиназную активность, которые выявляются по конечным продуктам расщепления (образование аммиака, H_2S , кислот и щелочей).

Например: разная ферментативная активность *E coli* регистрируется в среде Клиглера, содержащей лактозу, глюкозу и индикатор. В процессе жизнедеятельности микроорганизма углеводы разлагаются с образованием кислых продуктов распада. Изменение рН в кислую сторону приводит к изменению цвета среды с красного на желтый.

Рост и размножение бактерий

Рост – необратимое увеличение количества живого вещества, наиболее часто обусловленное делением клеток. Если у многоклеточных организмов обычно наблюдают увеличение тела, то у одноклеточных увеличивается количество клеток.

Размножение — это увеличение количества клеток в популяции

Бактерии размножаются поперечным (бинарным) делением с образованием двух идентичных особей. Их число растет в геометрической прогрессии: 2^0 — 2^1 — 2^2 — ... — 2^n .

Грам+ бактерии делятся посредством образования перегородки, вырастающей из клеточной стенки к центру. Грам- бактерии, включая риккетсии, истончаются в центре и разделяются перегородкой на две клетки (в виде гантели). Исключение составляют представители рода *Francisella*, размножающиеся способом, напоминающим почкование у дрожжей. Актиномицеты, как и грибы, могут размножаться спорами, а также путем фрагментации нитевидных клеток.

Рост бактерий в культуре может быть разделен на 4 фазы в зависимости от утилизации бактериями составляющих компонентов питательной среды:



Лаг-фаза (lag — англ. запаздывание) составляет период интенсивного физиологического приспособления, включающего индукцию новых ферментов, синтез и сборку рибосом.

Продолжительность фазы зависит главным образом от возраста бактерий и условий культивирования (в среднем — 4-5 часов). Если инокулят взят из старой культуры (в стационарной фазе роста), то бактериям необходимо время для адаптации к новым условиям. При отличии источников энергии и С в новой среде от имеющихся в предшествующей культуре адаптация в новых условиях может потребовать синтез новых ферментов, в которых ранее не было необходимости.

Логарифмическая (экспоненциальная) фаза характеризуется максимальной скоростью клеточного деления. Для конкретного вида бактерий в определенных условиях роста время генерации (т.е. необходимое для удвоения количества бактерий) постоянно в течение всей данной фазы, но варьируемо для различных видов. Время генерации может быть коротким, как у псевдомонад (14 мин), или продолжительным, как у *M. tuberculosis* (24 часа). Средняя продолжительность — 5-6 часов.

Стационарная фаза. В течение этого периода доступность важнейших питательных веществ становится лимитирующим фактором. Устанавливается равновесие между клеточным ростом и делением и процессом отмирания клеток. Спорообразующие бактерии (например, родов *Bacillus* и *Clostridium*) способны переходить в фазу споруляции — процесса, некоторым образом ликвидирующего дифференциацию прокариотической клетки и активирующегося при попадании бактерий в условия ограниченного питания.

В определенный момент количества отмирающих, вновь образующихся и покоящихся клеток становится равными. Подобное состояние известно как максимальная стационарная фаза и является достаточно стабильным для конкретного вида бактерий в стандартных условиях. Количество биомассы бактерий, достигнутое в стационарной фазе, обозначают термином «урожай» (разница между максимальной и исходной биомассой) и «выход клеток» или «экономический коэффициент», если прирост биомассы отнесен к единице лимитирующего роста субстрата.

Фаза спада (отмирания, гибели) включает период логарифмической гибели, переходящий в период уменьшения скорости отмирания бактерий. Иногда бактерии разрушаются под действием собственных ферментов. Продолжительность ее может достигать от 10 часов до нескольких недель.

У бактерий, способных утилизировать два различных источника углерода, наблюдают двухфазный рост. Для подобных микроорганизмов характерен начальный пик роста, когда бактерии утилизируют только один углевод. После истощения его запасов наступает стационарная фаза, во время которой в культуре иницируются синтез ферментов и механизмы транспорта для утилизации второго углевода.

Если физиологические условия удовлетворительны, в культуре бактерий начинается фаза вторичного экспоненциального роста, обусловленная утилизацией второго углевода.

Оценка роста бактерий.

Наиболее легко осуществляется в жидких средах. Для этого используют гомогенную суспензию клеток в жидкой среде. Увеличение количества клеток устанавливают, определяя концентрацию бактерий (количество клеток в 1 мл среды); а также увеличение клеточной массы — подсчитывая прирост массы на единицу объема среды.

Плотность бактерий оценивают, центрифугируя известный объем питательной среды и определяя массу осадка (так называемый сырой вес). Сухой вес определяют, выясняя массу центрифугата, высушенного при 100°C .

Фотометрические методы определения плотности бактерий основаны на способности бактериальной суспензии поглощать свет пропорционально количеству бактерий.

Используют также микроскопический подсчет микроорганизмов с помощью различных счетных камер (Горяева) или счетчиков формы колтер, регистрирующих отрицательный заряд поверхности каждой микробной клетки (электронный подсчет).

Возможно проведение посева серии последовательных разведений бактериальной суспензии на твердую питательную среду с последующим подсчетом вторичных колоний. Здесь учитывается тот факт, что одна клетка дает начало одной колонии. Количество клеток в 1 мл исходной суспензии подсчитывают, умножая число колоний, выросших при посеве 1 мл разведенной микробной суспензии на твердую питательную среду, на степень разведения.

Контрольные вопросы:

1. Что такое биологическое окисление?
2. На какие группы по отношению к кислороду разделяются все бактерии?
3. Какие стадии проходит любое брожение?
4. Какое значение для идентификации микроорганизмов имеет ферментативная активность?
5. Какие фазы выделяют в процессе роста бактерий?