

# Лекция № 4.

## Физиология и принципы культивирования микроорганизмов

МИКРОБИОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ

2014-2015

## Метаболизм микроорганизмов

Для роста и размножения микроорганизмы нуждаются в веществах, используемых для построения структурных компонентов клетки и получения энергии. **Метаболизм** (т.е. обмен веществ и энергии) имеет две составляющих- **анаболизм** и **катаболизм**. Анаболизм- синтез компонентов клетки (*конструктивный обмен*). Катаболизм- энергетический обмен, связан с окислительно- восстановительными реакциями, расщеплением глюкозы и других органических соединений, синтезом АТФ. Питательные вещества могут поступать в клетку в растворимом виде (это характерно для прокариот)- *осмотрофы*, или в виде отдельных частиц- *фаготрофы*.

Основным регулятором поступления веществ в бактериальную клетку является цитоплазматическая мембрана. Существует четыре основных механизма поступления веществ:

- пассивная диффузия*- по градиенту концентрации, энерго-**не**-затратная, не имеющая субстратной специфичности;
- *облегченная диффузия*- по градиенту концентрации, субстратспецифичная, энерго-**не**-затратная, осуществляется при участии специализированных белков *пермеаз*;
- *активный транспорт*- против градиента концентрации,

субстратспецифичен (специальные связывающие белки в комплексе с пермеазами), энергозатратный (за счет АТФ), вещества поступают в клетку в химически неизменном виде;

- *транслокация (перенос групп)*- против градиента концентрации, с помощью фосфотрансферной системы, энергозатратна, вещества (преимущественно сахара) поступают в клетку в фосфорилированном виде.

***Основные химические элементы- органогены***, необходимые для синтеза органических соединений- ***углерод, азот, водород, кислород***.

В зависимости от источника потребляемого *углерода* микробы подразделяют на *аутотрофы* (используют CO<sub>2</sub>) и *гетеротрофы* (используют готовые органические соединения). В зависимости от *источника энергии* микроорганизмы делят на *фототрофы* (энергию получают за счет фотосинтеза- например, цианобактерии) и *хемотрофы* (энергия добывается за счет химических, окислительно-восстановительных реакций). Если при этом донорами электронов являются неорганические соединения, то это *литотрофы*, если органические- *органотрофы*. Если бактериальная клетка в состоянии синтезировать все необходимые для жизнедеятельности вещества, то это

*прототрофы*. Если бактерии нуждаются в дополнительных веществах (факторах роста), то это *ауксотрофы*. Основными факторами роста для труднокультивируемых бактерий являются пуриновые и пиримидиновые основания, витамины, некоторые (обычно незаменимые) аминокислоты, кровяные факторы (гемин) и др.

### **Дыхание микроорганизмов**

Путем дыхания микроорганизмы добывают энергию. *Дыхание-биологический процесс переноса электронов через дыхательную цепь от доноров к акцепторам с образованием АТФ*. В зависимости от того, что является конечным акцептором электронов, выделяют *аэробное и анаэробное дыхание*. При аэробном дыхании конечным акцептором электронов является молекулярный кислород ( $O_2$ ), при анаэробном-связанный кислород ( $-NO_3$ ,  $=SO_4$ ,  $=SO_3$ ).

**По типу дыхания** выделяют четыре группы микроорганизмов.

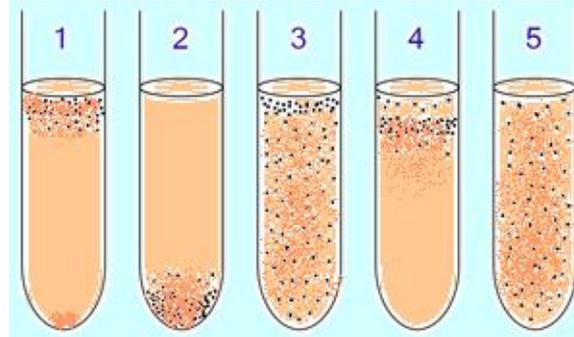
1. *Облигатные* (строгие) *аэробы*. Им необходим молекулярный (атмосферный) кислород для дыхания.
2. *Микроаэрофилы* нуждаются в уменьшенной концентрации (низком парциальном давлении) свободного кислорода. Для создания этих условий в газовую смесь для культивирования обычно добавляют  $CO_2$ ,

например до 10- процентной концентрации.

3. *Факультативные анаэробы* могут потреблять глюкозу и размножаться в аэробных и анаэробных условиях. Среди них имеются микроорганизмы, толерантные к относительно высоким (близких к атмосферным) концентрациям молекулярного кислорода - т.е. аэротолерантные, а также микроорганизмы которые способны в определенных условиях переключаться с анаэробного на аэробное дыхание.

4. *Строгие анаэробы* размножаются только в анаэробных условиях т.е. при очень низких концентрациях молекулярного кислорода, который в больших концентрациях для них губителен.

Аэробные и анаэробные бактерии предварительно идентифицируются в жидкой питательной среде по градиенту концентрации  $O_2$  следующим образом:



**1 - Обязательные аэробные** (нуждающиеся в кислороде) бактерии в основном собираются в верхней части пробирки, чтобы поглощать максимальное количество кислорода. (Исключение: микобактерии — рост пленкой на поверхности из-за восколипидной мембраны.)

**2 - Обязательные анаэробные** бактерии собираются в нижней части, чтобы избежать кислорода (либо не дают роста).

**3 - Факультативные анаэробные** бактерии собираются в основном в верхней части пробирки (окислительное фосфорилирование является наиболее выгодным, чем гликолиз), однако они могут быть найдены на всем протяжении среды, так как от  $O_2$  не зависят.

**4 - Микроаэрофилы** собираются в верхней части пробирки, но их оптимум — малая концентрация кислорода.

**5 - Аэротолерантные анаэробы** не реагируют на концентрации кислорода и равномерно распределяются по пробирке.

Биохимически анаэробное дыхание протекает по типу бродильных процессов, молекулярный кислород при этом не используется.

Аэробное дыхание энергетически более эффективно (синтезируется большее количество АТФ).

В процессе аэробного дыхания образуются токсические продукты окисления ( $\text{H}_2\text{O}_2$  - перекись водорода,  $\text{O}_2^-$  - супероксид-анион и  $\text{O}\cdot$  - синглерный кислород), от которых защищают специфические ферменты, прежде всего *каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза*. У анаэробов эти ферменты отсутствуют, также как и система регуляции окислительно-восстановительного потенциала ( $r\text{H}_2$ ).

### **Основные методы создания анаэробных условий для культивирования микроорганизмов**

1. Физический- откачивание воздуха, введение специальной газовой безкислородной смеси (чаще-  $\text{N}_2$ - 85%,  $\text{CO}_2$ - 10%,  $\text{H}_2$ - 5%).
2. Химический- применяют химические поглотители кислорода.
3. Биологический- совместное культивирование строгих аэробов и анаэробов (аэробы поглощают кислород и создают условия для размножения анаэробов).
4. Смешанный- используют несколько разных подходов.

Необходимо отметить, что создание оптимальных условий для строгих анаэробов- очень сложная задача. Очень непросто обеспечить постоянное поддержание безкислородных условий культивирования, необходимы специальные среды без содержания растворенного кислорода, поддержание необходимого окислительно-восстановительного потенциала питательных сред, взятие и доставка, посев материала в анаэробных условиях.

Существует ряд приемов, обеспечивающих более подходящие условия для анаэробов- предварительное кипячение питательных сред, посев в глубокий столбик агара, заливка сред вазелиновым маслом для сокращения доступа кислорода, использование герметически закрывающихся флаконов и пробирок, шприцев и лабораторной посуды с инертным газом, использование плотно закрывающихся эксикаторов с горящей свечой. Используются специальные приборы для создания анаэробных условий - анаэроостаты. Однако 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.

## **Основные принципы культивирования микроорганизмов на питательных средах.**

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.

По температурному оптимуму роста выделяют три основные группы микроорганизмов.

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 С).

3. Термофилы- растут при температурах выше плюс 45 градусов.

### **Краткая характеристика питательных сред.**

*По консистенции* выделяют жидкие, плотные (1,5- 3% агара) и полужидкие (0,3- 0,7 % агара) среды.

*Агар*- полисахарид сложного состава из морских водорослей, основной отвердитель для плотных (твердых) сред. В качестве

универсального источника углерода и азота применяют *пептоны*-продукты ферментации белков пепсином, различные *гидролизаты*-мясной, рыбный, казеиновый, дрожжевой и др.

*По назначению* среды разделяют на ряд групп:

- универсальные (простые), пригодные для различных нетребовательных микроорганизмов (мясо- пептонный бульон- МПБ, мясо- пептонный агар- МПА);
- специальные- среды для микроорганизмов, не растущих на универсальных средах (среда Мак- Коя на туляремию, среда Левенштейна- Йенсена для возбудителя туберкулеза);
- дифференциально- диагностические- для дифференциации микроорганизмов по ферментативной активности и культуральным свойствам ( среды Эндо, Плоскирева, Левина, Гисса);
- селективные (элективные)- для выделения определенных видов микроорганизмов и подавления роста сопутствующих- пептонная вода, селенитовая среда, среда Мюллера.

*По происхождению* среды делят на естественные, полусинтетические и синтетические.

## Рост и размножение микроорганизмов

Бактериальные клетки размножаются в результате деления. Основные стадии размножения микробов в жидкой среде в стационарных условиях:

- **лаг- фаза** (начальная стадия адаптации с медленным темпом прироста биомассы бактерий);
- **экспоненциальная** (геометрического роста) фаза с резким ростом численности популяции микроорганизмов ( $2$  в степени  $n$ );
- **стационарная фаза** (фаза равновесия размножения и гибели микробных клеток);
- **стадия 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).

Данная динамика характерна для *периодических культур* с постепенным истощением запаса питательных веществ и накоплением метаболитов.

Если в питательной среде создают условия для поддержания микробной популяции в экспоненциальной фазе- это *хемотратные* (непрерывные) культуры.

Характер роста бактерий на плотных и жидких питательных средах: сплошной рост, образование колоний, осадок, пленка, помутнение.

Чистая культура- популяция одного вида микроорганизмов.

Основные принципы получения чистых культур: механическое разобщение, рассев, серийные разведения, использование селективных сред, особых условий культивирования (с учетом устойчивости некоторых микробов к определенным температурам, кислотам, щелочам, парциальному давлению кислорода, рН и мн.др).